



**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur  
**Erlangung der Doktorwürde**  
der  
**Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät**  
der  
**Ruprecht-Karls-Universität**  
**Heidelberg**

vorgelegt vom  
approbierten Apotheker  
Markus Wolf  
aus Bad Schwalbach

**Tag der mündlichen Prüfung: 12. Januar 2005**

***N*-[2-(Dialkylamino)ethyl]benzamide als melanomaffine  
Trägermoleküle für Zytostatika und Gadoliniumkomplexe**

Gutachter:

**Prof. Dr. Michael Eisenhut  
Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte**

gewidmet meinen Eltern und meiner lieben Carolin

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. M. Eisenhut danke ich für seine hervorragende Betreuung, besonders dafür, dass er mir einen so großen Gestaltungsspielraum bei der Bearbeitung des Themas überlassen hat. Außerdem war er jederzeit zu Diskussionen bereit.

Herrn Prof. Dr. N. Metzler-Nolte danke ich, dass er als Zweitgutachter dieser Arbeit zur Verfügung steht.

Frau Bauder-Wüst gilt mein besonderer Dank für die Durchführung der Zellkulturversuche.

Frau Schwebel-Schilling von der Zentralen Spektroskopie des DKFZ danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren, und Herr Erben von der Zentralen Spektroskopie des DKFZ hat die ESI-Massenspektren aufgenommen.

Herr Frank Schönsiegel (Abteilung: Klinische Kooperationseinheit Nuklearmedizin) hat die Zellaufnahmestudien und die Organverteilungen mit den radioaktiven Benzamiden durchgeführt.

Herr Dr. A. Mohammed hat die Radioiodierungen vorgenommen.

Herrn Dr. Pipkorn und Herrn Koch (Peptidsyntheseinheit des DKFZ) danke ich für die Durchführung der Festphasensynthese.

Herrn Dr. M. Krachler (Universität Heidelberg, Institut für Umweltgeochemie) und Herrn Dr. Ralf Krüger (DKFZ Heidelberg, Abteilung Zentrale Spektroskopie) danke ich für die Durchführung der ICP-MS Messungen.

Der Abteilung Molekulare Toxikologie des DKFZ möchte ich dafür danken, dass ich den Fluoreszenzreader nutzen durfte.

Herrn Dr. Spring (Analytische Mikroskopie und Mikroinjektion) danke ich für die Benutzung des konfokalen Mikroskopes.

Herrn A. Runz (Chemietechniker) und Frau U. Wagner-Utermann (Chemielaborantin) danke ich für die Unterstützung in chemisch-technischen Fragestellungen.

Frau Spiecker (MTA der Abteilung Medizinische Physik in der Radiologie) danke ich dafür, dass ich das Mikrowellenaufschlußgerät benutzen durfte.

Herrn Dr. Eisenbarth danke ich für seine Hilfe bei der Bewältigung von technischen Problemen mit der HPLC.

Für ihre Diskussionsbereitschaft danke ich Frau Dr. C. Bauer und Herrn Dr. M. Schumacher.

Weiterhin danke ich Frau Stamm, Frau Guschl, Herrn Schäfer, Herrn Rahn, Frau Marx, Herrn Weber, Frau Helfert, Herrn Matys und Herrn Hauser für das freundliche Arbeitsklima.

## Abkürzungsverzeichnis:

Arg = Arginin  
Boc = tert-Butyloxycarbonyl  
4-CAP = Cysteinaminophenol  
CDI = Carbonyldiimidazol  
cpm = counts per minutes  
D = Dublett  
DC = Dünnschichtchromatografie  
DCC = Dicyclohexylcarbodiimid  
DCU = Dicyclohexylurea  
Dde = 1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl  
DIEPA = Diisopropylethylamin  
DMAP = Dimethylaminopyridin  
DMF = Dimethylformamid  
DMSO = Dimethylsulfoxid  
DNS = Desoxyribonukleinsäure  
DOTA = (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid)  
DTPA = Diethylentriaminpentaessigsäure  
EDC = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid  
EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure  
EPR = Enhanced Retention and Permeability  
ESI = Electrospray Ionization  
Fmoc = Fluorenylmethyloxycarbonyl  
Gly = Glycin  
HATU = *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphat  
HBED-CC = *N,N'*-[2 hydroxy 5-(ethylenecarboxy) benzyl]ethylene diamine *N,N'*diacetic acid  
HBTU = 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat  
HFR = high affinity folate receptor  
HIV = Human immunodeficiency virus  
HPLC = high performance liquid chromatography  
HOBt = 1-Hydroxybenzotriazol  
HR = high resolution  
IC<sub>50</sub> = 50% inhibitory concentration  
I-Effekt = induktiver Effekt  
I-BZA = *N*-(2-diethylaminoethyl)-4-iodobenzamide  
ICP = inductively coupled plasma  
K<sub>D</sub> = Dissoziationskonstante  
Log P = dekadischer Logarithmus des Wasser-n-Octanol-Verteilungskoeffizienten  
Lys = Lysin  
M = Multiplett  
MBq = Megabequerell  
MHz = Megahertz  
MP = melting point  
MS = Massenspektrometrie  
MSH = Melanotropin Stimulating Hormone

MR-Signal = Magnetresonanz Signal  
MRT = Magnetresonanztomographie  
NMR = nuklear magnet resonanz  
PTU = Phenylisothiurea  
Q = Quartett  
Rp = reversed phase  
RT = Raumtemperatur  
S = Singulett  
S-Phase = Synthesephase des Zellzyklus  
T = triplett  
TEA = Triethylamin  
TFA = Trifluoressigsäure  
Tris = Tris-(hydroxymethyl)aminoethan  
VAT = vacuolar ATPase  
ZNS = Zentrales Nervensystem





# Inhaltsverzeichnis

1.1. Zusammenfassung der Dissertation.....	1
1.2. Abstract.....	2
2. Einleitung.....	3
2.1. Krebserkrankungen - Definition, Pathogenese .....	3
2.2. Krebsdiagnostik mittels bildgebender Verfahren .....	3
2.2.1. Krebsdiagnostik mittels Magnetresonanztomographie .....	3
2.2.1.1 Kernspintomografie - Definition, Funktionsprinzip.....	3
2.2.1.2. MRT-Kontrastmittel - Begriffsdefinition, Funktionsprinzip.....	4
2.2.1.2.1. Spezifische und unspezifische MRT-Kontrastmittel .....	4
2.2.1.2.2. Intrazelluläre MRT-Kontrastmittel.....	5
2.3. Therapie von Krebserkrankungen - Prinzipielle Methoden .....	6
2.3.1. Chemotherapie maligner Tumore [1], [4].....	6
2.3.1.2. Zytostatika mit größerer Selektivität für Krebszellen .....	8
2.4. Melanozyten, Melanosomen und Melanin .....	9
2.5. Das maligne Melanom [41], [42] .....	12
2.5.1. Melanomspezifische MRT-Kontrastmittel .....	12
2.5.2. Therapie des malignen Melanoms .....	13
2.5.3. Strategien zur Verbesserung der Therapie des metastasierenden malignen Melanoms..	13
2.6. Melanin - Arzneistoff/Chemikalien-Interaktionen .....	14
2.6.1 Melanomaffinität der <i>N</i> -[2-(Dialkylamino)ethyl]benzamide .....	15
3. Aufgabenstellung.....	17
4. Ergebnisse und Diskussion.....	18
4.1. Chemie – Synthesen/Reaktivität/physiokochemische Eigenschaften .....	18
4.1.1. Chlorambucil-Benzamid-Konjugate.....	18
4.1.1.1. Stabilität der Zytostatika mit einer [Bis-(2-chlorethyl)amino]-Funktion .....	18
4.1.1.2. Synthese der Chlorambucilkonjugate .....	18
4.1.2. Benzamidzytostatika mit [Bis- (2-chlorethyl)amino]-funktion.....	20
4.1.3. Benzamide mit einer Triazenfunktion .....	22
4.1.4. Benzamid-Anthracyclin-Derivat .....	25
4.1.5. Methotrexat-Benzamidkonjugate .....	25
4.1.6. Kupfer-Dithiocarbamat.....	27
4.1.7.1. Synthese der Chelatliganden .....	28
4.1.8. Synthese der Gadoliniumkomplexe.....	31
4.1.8.1. DOTA-Procaïnamid.....	31
4.1.8.2. Versuche zur Synthese von {4-Hydroxy-3-[4,7,10-tris-(5-carboxymethyl-2-hydroxy- benzyl)-1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl-methyl]-phenyl}-essigsäure .....	32
4.1.8.3. EDTA-Procaïnamid 43 .....	33
4.8.1.4. DTPA-Benzamide .....	35
4.1.8.4.1. Addition von Benzamiden an p-Isothiocyanatobenzyl-diethylentriamin- pentaessigsäure .....	35
4.1.8.4.2. DTPA-Benzamid-Konjugate .....	36
4.1.8.4.3. DTPA-Diethylaminoethylamin-Nonylamin-Konjugat.....	36
4.1.8.5. Konjugation der Benzamid-DOTA- und Benzamid-DTPA-Komplexe mit Schleppermolekülen zur Verbesserung der Aufnahme in die Zelle .....	37

4.1.8.5.1. Polyarginin als Schlepper .....	37
4.1.8.5.2. Folsäure als Schlepper .....	40
4.1.8.5.3. Polyamine als Schlepper.....	41
4.2. Biologische Experimente.....	44
4.2.1. Anreicherungskinetik und Organverteilung von Benzamidkonjugaten in B16 Melanomzellen .....	44
4.2.2. Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessungen.....	47
4.2.2.1. Chlorambucil-Konjugate .....	47
4.2.2.2. Benzamide mit 4-{[Bis-(2-chlorethyl)]amino}-Funktion .....	49
4.2.2.3. Benzamide mit Triazenstrukturelement.....	51
4.2.2.4. Anthracyclinderivat .....	54
4.2.2.5. Kupfer-Dithiocarbamat.....	54
4.2.2.6. Benzamid-Methotrexat-Konjugate .....	55
4.2.2.7. Platinkomplex mit Benzamidchelatligenanden .....	56
4.2.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessungen .....	57
4.3. Theorie über die generell verbesserte Wirksamkeit der Benzamidzytostatika im Vergleich zu Chlorambucil und Dacarbazin .....	58
4.3.1. Erklärungsversuch für die verbesserte Wirkung von alkylierenden Benzamidzytostatika im Vergleich mit Chlorambucil und Dacarbazin.....	58
4.3.2. Bestimmung der DNS-Affinität von Benzamiden.....	61
4.3.3. Ergebnisse des Ethidiumbromid-Austausch-Assays .....	62
4.4. Abfangtheorie .....	63
4.4.1. Nachweis der hohen Bindungskapazität der Benzamide an B16 Melanome .....	64
4.4.2. Melaninaffinität der Benzamidzytostatika – Bestimmung der Bindungsisothermen.....	65
4.4.3. Einfluß von Melanin auf die Zytotoxizität von Benzamidzytostatika.....	66
4.4.4. Struktur-Wirkungs-Beziehung für DNS- und Melaninaffinität.....	70
4.4.5. Beeinflussung des intramelanosomalen pH-Wertes durch Benzamidkonjugate und simultane Darstellung der Apoptoseinduktion durch Benzamidzytostatika mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.....	71
4.4.6. Beeinflussung des Melaningehaltes und der Tyrosinaseaktivität durch Benzamidkonjugate .....	73
4.4.7. Anreicherungsmechanismus und Schlussfolgerungen .....	74
4.5. Zellaufnahmestudien der Gadoliniumkomplexe .....	75
5. Experimenteller Teil.....	81
5.1. Materialien und Methoden.....	81
5.1.1. Bestimmung des Gadoliniumgehaltes in biologischen Proben .....	82
5.1.1.1. Hochdruckmikrowellenaufschluß [120] .....	82
5.1.1.2. Hochauflösende ICP-Massenspektrometrie [120].....	82
5.2. Chemische Synthesen .....	83
5.2.1. Benzamidzytostatika.....	83
5.2.1.1. Chlorambucilkonjugate .....	83
5.2.1.2. Benzamide mit 4-[Bis-(2-chlorethyl)-amino]-Funktion .....	85
5.2.1.3. Benzamide mit Triazenstruktur .....	89
5.2.1.4. Benzamid mit Anthracyclinstruktur .....	94
5.2.1.5. Benzamid-Methotrexat-Konjugate .....	95
5.2.1.6. Dithiocarbamate.....	96
5.2.1.7. Platinkomplexe mit Benzamidstrukturelement .....	97

5.2.2. Gadoliniumkomplexe .....	100
5.3. Zellkulturversuche/ Biologische Experimente .....	113
5.3.1. Zellfreie Versuche .....	113
5.3.1.2. Bestimmung der Bindungsisotherme [123].....	113
5.3.2. Zellkulturversuche .....	113
5.3.2.1. In-vitro Zellaufnahme Studien.....	113
5.3.2.2. Organverteilungsstudien [124] .....	114
5.3.2.3. Zytotoxizitätsuntersuchungen [125] .....	114
5.3.2.4. Konkurrenzexperiment .....	115
5.3.2.5. Einfluß von synthetischem extrazellulärem Melanin auf die Zytotoxizität der Benzamide [106].....	115
5.3.2.6. Einfluß eines niedrigen intrazellulären Melaningehaltes in B16 Melanomzellen auf die Zytotoxizität von Verbindung 1,9,16 und 26 [108].....	115
5.3.2.7. Einfluß der Benzamidkonjugate auf den pH-Wert der B16-Melanomzellen [105]	115
5.3.2.8. Einfluß der Benzamidkonjugate auf die Tyrosinaseaktivität von B16 Melanom Zellen [115] .....	116
5.3.2.9. Einfluß der Benzamidkonjugate auf den Melaningehalt von B16 Melanomzellen [126] .....	116
5.4. Zellaufnahmestudien der Gadoliniumkomplexe .....	116
6. Literaturverzeichnis .....	118
Beiblatt 1 und 2 (s. Seite 125 und 126).....	Strukturformeln der Benzamid- zytostatika, mit denen biologische Experimente durchgeführt wurden

## **Veröffentlichungen:**

**Wolf M.**, Bauder-Wüst U., Mohammed A., Schonsiegel F., Mier W., Haberkorn U., Eisenhut M. Alkylating benzamides with melanoma cytotoxicity. *Melanoma Res.* 2004 Oct;14(5):353-360.

**Wolf M.**, Bauder-Wüst U., Mier W., Haberkorn U., Eisenhut M. Alkylating benzamides with melanoma cytotoxicity; Role of melanin, tyrosinase, intracellular pH and DNA interaction. Im August 2004 an Melanoma Research übermittelt.

## **Kongreßbeiträge**

42. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin eV vom 21.-24. April 2004 in Rostock. Calderon Sanchez O., A. Mohammed, J. Schuhmacher, **M. Wolf**, W. Mier, U. Haberkorn, M. Eisenhut. OC2, ein heterobifunktioneller Ligand mit aktivierter Esterfunktion für die Tc-99m-Markierung von Proteinen. Abstract: V174. Erschienen in *Nuklearmedizin* 2004, 43(2).

Annual congress of the European Association of Nuclear Medicine - September, 4-8 2004 Helsinki Fair Centre, Finland. **Wolf, M.**, Bauder-Wüst, U., Mohammed, A., Schönsiegel, F., Mier, W., Haberkorn, U., Eisenhut, M. AKYLATING BENZAMIDES WITH MELANOMA CYTOTOXICITY. Posterpräsentation.

Abstract erschienen in *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. Title: Abstracts of the Annual Congress of the EANM, Helsinki, 2004, Volume 21, Supplement 2.

DPhG Jahrestagung und Joint Meeting 2004 vom 7. - 9. Oktober 2004 in Regensburg. **Wolf, M.**, Bauder-Wüst, U., Mohammed, A., Schönsiegel, F., Mier, W., Haberkorn, U., Eisenhut, M. AKYLATING BENZAMIDES WITH MELANOMA CYTOTOXICITY. Posterpräsentation und fünfminütiger Kurzvortrag.

## 1.1. Zusammenfassung der Dissertation

Wolf, Markus, Apotheker

*N*-[2-(Diethylamino)ethyl]benzamide als melanomaffine Trägermoleküle für Zytostatika und Gadoliniumkomplexe

Referent: Prof. Dr. Michael Eisenhut

Koreferent: Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte

Wegen ihrer hohen in vivo Melanomaffinität wurden *N*-[2-(Diethylamino)ethyl]benzamide als melanomselektive Trägermoleküle für Zytostatika ausgewählt. Es wurden Chlorambucilkonjugate, Chlorambucilanaloge, Dacarbazinanaloge, Methotrexatkonjugate, ein Platinkomplex und ein Anthrazyklinkonjugat synthetisiert, analytisch charakterisiert und ihre IC<sub>50</sub>-Werte für murine B16 Melanomzellen, SkMel 28 (humane Melanomzellen), Mausfibroblasten, MH3924A (Morris Hepatom) und HeLa (humanes Zervixkarzinom) ermittelt. Alle Chlorambucilkonjugate und 3 von 5 Chlorambucilanaloge erwiesen sich für jede der getesteten Zelllinien toxischer als Chlorambucil. Drei Chlorambucilkonjugate waren für die Melanomzellen toxischer als Dacarbazin. Zwei Monotriazene und ein Bis-Triazen waren für die Melanomzellen potenter als Dacarbazin und Chlorambucil. Diese Triazene verursachten auch bei den anderen Zelllinien eine stärkere Proliferationshemmung. Alle anderen Benzamide mit Triazenstruktur zeigten keine zytostatische Aktivität. Das Anthrazyklinderivat wirkte besser als Dacarbazin und Chlorambucil. Der Platinkomplex war zytostatisch inaktiv. Obwohl Nicht-Melanomzellen keine Anreicherung der Benzamid-Zytostatika zeigten, waren die Benzamid-Zytostatika auch für diese Zelllinien toxischer als Chlorambucil und Dacarbazin. Um die mechanistischen Gründe dieser Versuchsbeobachtungen aufzudecken, wurden die DNS- und Melaninaffinitäten von vier verschiedenen Benzamidzytostatika sowie von den Zytostatika Dacarbazin und Chlorambucil ermittelt. Zusätzlich wurde der Einfluß von extrazellulärem, synthetischen Melanin auf die Zytotoxizität der Verbindungen für B16 und MH3924A Zellen untersucht. Untersuchungen über die Auswirkungen der Zytostatika auf den intramelanosomalen pH-Wert, die Tyrosinaseaktivität und den Melaningehalt von B16 Melanomzellen schlossen diese Experimente ab. Es wurde gezeigt, dass das geteste Chlorambucilkonjugat und das Chlorambucilanalogon eine höhere DNS-Affinität aufweisen als Chlorambucil. Die Zytostatika mit einer Triazenfunktion im Molekül wurden zu einem größeren Ausmaß an die DNS gebunden als die anderen Zytostatika, wobei die Triazen-Benzamide stärker an DNS gebunden wurden als Dacarbazin. Die IC<sub>50</sub>-Werte für B16 Melanomzellen korrelieren mit der Melaninaffinität der Benzamid-Zytostatika. Je höher die Melaninaffinität ist, desto geringer ist die zytostatische Wirkung. Die Benzamidzytostatika heben den intramelanosomalen pH-Wert an, was zu einer Erhöhung der Tyrosinaseaktivität und damit auch des Melaningehaltes führt. Die Folge dieser Reaktionskette ist die Verstärkung des Abfangeffektes für Benzamid-Zytostatika. Außerdem wurde der Versuch unternommen, durch Konjugation von Gadoliniumchelatoren mit *N*-[2-(Diethylamino)ethyl]benzaminen, melanomspezifische MRT-Kontrastmittel zu erhalten. Die Konjugation von *N*-[2-(Diethylamino)ethyl]benzaminen an DOTA oder DTPA führte zu einer geringen Aufnahme von Gadolinium in die Zellen. Durch die Verwendung von Schleppermolekülen konnte eine Verbesserung der Aufnahme von Gadolinium in die Zellen erzielt werden, allerdings war die in MH3924A gefundene Gadoliniummenge größer als in den B16 Melanomzellen. Die Polyamine waren die effektivsten Schleppermoleküle.

## 1.2. Abstract

Wolf, Markus, pharmacist

*N*-[2-(Diethylamino)ethyl]benzamides as melanoma affine carrier molecules for cytostatics and gadolinium chelates

Referent: Prof. Dr. Michael Eisenhut

Coreferent: Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte

Due to their high in vivo affinity to malignant melanoma *N*-[2-(diethylamino)ethyl]benzamides were considered as melanoma selective carriers of alkylating drugs and methotrexate. Chlorambucil conjugates, chlorambucil analogues, dacarbazine analogues, methotrexate conjugates, a platinum complex and an anthracycline conjugate were synthesized, characterized and their IC<sub>50</sub>-values were determined for B16 melanoma, SkMel 28 human melanoma, NIH 3T3 fibroblasts, Morris-hepatoma (MH3924A) and human cervix carcinoma (HeLa) cells. All chlorambucil conjugates and 3 of 5 chlorambucil analogues were more toxic than chlorambucil for all tested cell lines. Three chlorambucil conjugates were toxic for melanoma cells than dacarbazine. Two monotriazenes and one bistriazene were more potent than chlorambucil and dacarbazine. But the other cell lines were sensitive as well. All other synthesized benzamide derivatives with a triazene function were not toxic. Conjugates of *N*-(2-(diethylamino)ethyl)benzamides with methotrexate were not superior over methotrexate. The anthracycline conjugate was more potent than the anticancer drugs chlorambucil and dacarbazine. The platinum complex had no cytostatic effect. Even though these agents were not accumulated by non-melanoma cells they were also found to be more toxic for them. In order to find mechanistic reasons for this effect, DNA- and melanin-binding affinities of four benzamide-drug conjugates together with the parent compounds were measured. Additionally, the influence of melanin on the cytotoxicity of B16 melanoma and Morris hepatoma cells (MH3924A) and the influence of these substances on the melanosomal pH, tyrosinase activity and melanin content in B16 melanoma cells was examined. It could be shown that all tested chlorambucil conjugates and analogues have a higher DNA affinity than chlorambucil. The compounds with a triazene functionality were bound stronger to the DNA than the other cytostatics. The triazene benzamides exhibited a higher DNA affinity than dacarbazine. The obtained IC<sub>50</sub>-values correlate with the melanin affinity of the benzamide derivatives. High melanin affinity resulted in a lower cytotoxic effect. These compounds raise the acidic pH of melanosomes thereby enhancing tyrosinase activity and elevating the melanin content. The consequence of this reaction chain is an enhancement of the scavenging effect for benzamide-drug conjugates. Furthermore it was evaluated whether conjugating *N*-[2-(diethylamino)ethyl]benzamides to gadolinium chelators results melanoma specific MRI contrast agents. DOTA- and DTPA- conjugates of *N*-[2-(diethylamino)ethyl]benzamides yielded only in low gadolinium uptake. By using carrier molecules the gadolinium uptake could be improved, whereby the polyamines resulted in the highest internalised gadolinium values. The hepatoma cells internalised the complexes to a greater extend than the B16 melanoma cells.

## **2. Einleitung**

### **2.1. Krebserkrankungen - Definition, Pathogenese**

Unter dem Begriff Krebs werden bösartige Tumorerkrankungen zusammengefasst, die nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den Industrienationen darstellen. Überwiegend ältere Menschen (60 Jahre und älter) sind davon betroffen, bei jüngeren Menschen treten Krebserkrankungen seltener auf. Krebszellen entstehen aus Körperzellen durch Genmutationen, die bei der Regulation der Zellteilung eine Rolle spielen. Die Mutationen können durch energiereiche ionisierende Strahlung, chemische Verbindungen, die mit der DNS reagieren können oder bestimmte Viren, hervorgerufen werden. Krebszellen teilen sich unkontrolliert, weil sie auf proliferationsregulierende Botenstoffe nicht adäquat reagieren können, die von anderen Geweben gebildet werden. Aus einem zunächst örtlich begrenzten Tumor entsteht ein Tumorherd, der die Gewebsgrenzen durchdringt, in andere Organe einwuchert und die Bildung neuer Blutgefäße bewirkt, damit seine Versorgung mit Nährstoffen optimal gewährleistet ist. Schließlich werden kleine Zellverbände des Ausgangsherd über die Blutbahn oder den Lymphweg in entfernt liegende Organe verschleppt, wo sich Tumorabsiedlungen (Metastasen) bilden. Die Früherkennung ist wichtig, weil dies die Chance auf eine vollständige Heilung erhöht. [1], [2], [3],[4], [5]

### **2.2. Krebsdiagnostik mittels bildgebender Verfahren**

#### **2.2.1. Krebsdiagnostik mittels Magnetresonanztomographie**

Die Magnetresonanztomographie wird zur Untersuchung fast aller Organe eingesetzt, besonders für Untersuchungen des zentralen Nervensystems. Fast jede Erkrankung des Gehirns führt zu meßbaren Veränderungen des Wassergehaltes im erkrankten Gewebe. Die MRT stellt mittlerweile den Goldstandard für die Diagnose und Verlaufskontrolle bei Multipler Sklerose dar. [7] In der Krebsdiagnostik läßt sich der Tumor genau lokalisieren, was für die Planung einer Operation wichtig ist. Die Verlaufskontrolle einer Behandlung ist ebenfalls möglich. [8] Dabei liefert die MRT mehr als nur anatomische Bilder. Durchblutung und Temperatur des Gewebes können bestimmt werden. [7]

##### **2.2.1.1 Kernspintomografie - Definition, Funktionsprinzip**

"Bei der MRT handelt es sich um ein nichtinvasives bildgebendes Diagnoseverfahren unter Nutzung eines Magnetfeldes hoher Feldstärke sowie von in gepulster Form eingestrahltten Radiowellen im Megahertz-Band von geringer Intensität. Hierdurch werden Protonen der Wasser- und Fettbestandteile im Organismus zur Kernspinresonanz angeregt. Nach Abschalten der MHz-Anregungsfrequenz werden die MR-Signale durch die Empfängerspulen, die den Patienten umgeben, aufgenommen. Das Signal ist von der Wasserstoffdichte und den Abklingzeiten abhängig. Durch Rechenoperationen eines Computers werden viele Messungen in verschiedenen Richtungen zu einem Schichtbild (Tomogramm) zusammengesetzt, das in Grau- oder Farbtonabstufungen Aufschluß über die räumliche Wasserstoffverteilung und ihre Wechselwirkungen mit der Umgebung gibt; z.B. können je nach Aufnahmeverfahren wasser- oder fettreiche Gewebe als helle Flächen, wasserstoffarme Gewebe sowie schnellströmende Blutanteile als dunkle Flächen ohne Behinderung durch Knochenstrukturen erscheinen. Die MR-

Tomographie kommt zur Anwendung als Ganzkörperuntersuchung und zur Diagnostik krankhafter Veränderungen, z.B. des ZNS, von Leber, Niere, Pankreas, Harnblase und Auge sowie des Herz- und Kreislaufsystems. Sie ermöglicht durch die dargestellten Wasserstoffdichte- und Relaxationszeitunterschiede die scharfe Abgrenzung von Tumoren (Neoplasien), Ödemen, Blutungen (Hämorrhagien) oder Nekrosen gegenüber der gesunden Umgebung. Eine Kontrastverstärkung ist möglich durch Anwendung einer Gadolinium(Gd)-Komplexverbindung (Seltenerdmetall). Gd besitzt in der äußeren Elektronenhülle 7 Elektronen, woraus sich starke paramagnetische Eigenschaften ergeben. Der Paramagnetismus des Gd bewirkt eine Veränderung des Magnetfeldes im untersuchten Organ. Damit erreicht man eine Kontrastverstärkung des Bildes, ohne dass das Gd eigene Signale aussendet." [5] Die physikalischen Grundlagen der MRT sind die gleichen wie bei der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie. Die MRT kommt ohne ionisierende Strahlen aus und wird als gesundheitsneutral eingestuft. Nachteile der MRT sind der hohe Zeit- und Kostenaufwand. Patienten mit Herzschrittmachern oder metallischen Implantaten können nicht mittels MRT untersucht werden. [9]

### **2.2.1.2. MRT-Kontrastmittel - Begriffsdefinition, Funktionsprinzip**

MRT-Kontrastmittel sollen eine bessere Bildgebung ermöglichen. Mit ihrer Hilfe soll der Kontrast zwischen verschiedenen Geweben verbessert werden. Die meisten MRT-Kontrastmittel sind gadoliniumhaltige, niedermolekulare, gut wasserlösliche, extrazelluläre Verbindungen. [10] Gadolinium(III)-Kationen weisen aufgrund ihrer sieben ungepaarten Elektronen einen hohen Paramagnetismus auf. Diese Eigenschaft macht sie zu geeigneten Bestandteilen von MRT-Kontrastmitteln. Gadolinium(III)-Kationen haben den gleichen Ionenradius wie Calcium(II)-Kationen. Daher können sie Calciumionenkanäle blockieren. Dies erklärt die Toxizität von Gadolinium(III)-Kationen. Aufgrund dieser Toxizität ist die Komplexbildung mit einem Liganden erforderlich, der mit Gadolinium(III) sehr stabile Komplexe bildet, so dass der Gadoliniumkomplex im Körper nicht dissoziiert und unverändert renal eliminiert wird. DTPA und DOTA sind Chelatliganden, die diesen Anforderungen gerecht werden. Lanthanoide bevorzugen hohe Koordinationszahlen. In MRT-Kontrastmittel hat Gadolinium(III) die Koordinationszahl neun. Der Chelatligand stellt acht Koordinationsstellen zur Verfügung, die neunte wird von einem Wassermolekül eingenommen. Dieses Wassermolekül ist essentiell für die Verwendung der Gadoliniumkomplexe als MRT-Kontrastmittel. Es kommt zu Wechselwirkungen zwischen den Elektronen des Gadoliniums und benachbarten Wasserstoffatomen. [11]

#### **2.2.1.2.1. Spezifische und unspezifische MRT-Kontrastmittel**

Meist handelt es sich um gewebsunspezifische Diagnostika, die sich im Interstitium von Geweben anreichern. Wenn ein Gewebe besonders gut durchblutet wird, dann reichern sich die Kontrastmittel im Interstitium dieser Gewebe an. Wenn die Barrierefunktion des Blutgefäßendothels gestört ist, dann können sich die Kontrastmittel im Zellzwischenraum der Gewebe anreichern, der an dieses Blutgefäßendothel grenzt und der normalerweise beim Vorliegen einer intakten Barriere nicht für die Kontrastmittel zugänglich wäre. [10] Besser als die unspezifischen MRT-Kontrastmittel, deren Anreicherungsmechanismus bereits besprochen wurde, sind gewebspezifische MRT-Kontrastmittel. Artemov beschreibt in einem Übersichtsartikel Strategien, mit denen man zu spezifischen MRT-Kontrastmitteln gelangen



kann. Die Konjugation eines Gadoliniumchelators an monoklonale Antikörper mit nachfolgender Komplexierung von Gadolinium führt zu spezifischen, aber extrazellulären MRT Kontrastmitteln. Eine Weiterentwicklung dieses Ansatzes stellt die Verwendung bispezifischer Antikörper dar. Zunächst appliziert man den Antikörper, der dann an das erste Antigen bindet. Dieses Antigen befindet sich auf der Zelloberfläche der Zielzelle. Durch die Bindung des Antikörpers an dieses Antigen wird der Antikörper an der Zelloberfläche festgehalten. Der bispezifische Antikörper erkennt jedoch nicht nur das zelluläre Antigen, sondern zusätzlich noch ein weiteres Epitop, nämlich ein Polypeptid, an das der Gd-Chelator kovalent gebunden ist. Einige Zeit nach der Gabe des Antikörpers wird ein Polypeptid-Gadolinium-Komplex-Konjugat verabreicht. Der Antikörper erkennt den Peptidanteil und bindet damit letztlich das Gadolinium. Der Vorteil zu den normalen monoklonalen Antikörpern besteht darin, dass das Polypeptidkonjugat kleiner ist als der Antikörper und somit besser aus dem Blut in das Interstitium gelangen kann. [12]

#### 2.2.1.2.2. Intrazelluläre MRT-Kontrastmittel

Die meisten Gadoliniumkomplexe werden nicht in Zellen aufgenommen, wobei Biomembranen die Hauptbarriere für die intrazelluläre Aufnahme von MRT-Kontrastmitteln darstellen. [13] Es gibt keine Gadoliniumkomplexe, die mittels Diffusion in die Zelle aufgenommen werden. Dazu sind die physikochemischen Eigenschaften zu ungünstig. Lipinski et al. beschreiben, welche Eigenschaften ein Molekül haben muss, um Biomembranen zu überwinden. Die folgende Tabelle zeigt, welche Moleküleigenschaften einer intrazellulären Aufnahme durch passive Diffusion entgegen stehen.

Schlechte Membranpassage ist zu erwarten, wenn ein Molekül mindestens eine dieser Eigenschaften besitzt:

1. Das Molekül weist mehr als fünf H-Donatoren auf (ausgedrückt als Summe von OH und NH)
2. Das Molekulargewicht ist größer als 500 Da
3. Der log P ist größer als 5.
4. Das Molekül weist mehr als zehn H-Bindungsakzeptoren auf (ausgedrückt als Summe von N- und O-Atomen)
5. Verbindungsklassen, die biologische Transporter ausnutzen, stellen Ausnahmen dar.

Tabelle 1: Lipinski's Rule of Five [14]

Die strukturellen Anforderungen an die Chelatliganden, die zur Komplexierung von Gadolinium notwendig sind, führen dazu, dass die Chelatoren ein Molekulargewicht über 500 Da haben und sehr hydrophil sind. Diese Eigenschaften stehen einer Aufnahme durch passive Diffusion der Gadoliniumkomplexe in die Zelle entgegen. Alle intrazellulären Gadoliniumkomplexe werden durch rezeptorvermittelte Endocytose internalisiert. Allen et al. konjugierten Polyarginin-Konjugate mit MRT-Kontrastmitteln, um eine verbesserte Aufnahme der MRT-Kontrastmittel zu erzielen. [13] Bhorade et al. konnten die zelluläre Aufnahme von DOTA-Gadolinium erhöhen, indem sie den Komplex an ein 13mer Tat-HIV-Peptid konjugierten. Die aufgenommene Menge reichte für eine MRT-Darstellung. [15] Eine weitere Möglichkeit der Internalisierung von Gadoliniumkomplexen in Zellen besteht darin, sie an Folsäure zu konjugieren. Die Aufnahme erfolgt über rezeptorvermittelte Endozytose. Allerdings müssen die Zellen den sogenannten High Affinity Folate Rezeptor (hFR) exprimieren, damit es zur Endocytose kommen kann. Zellen ohne

hFR internalisieren den Komplex nicht. [16], [17] Die durch Endocytose internalisierten Moleküle gelangen jedoch meist nicht ins Zytosol der Zelle, sondern befinden sich in von einer Biomembran umgebenen Vesikeln, den Endosomen. Die Endosomen verschmelzen mit Lysosomen, in denen sie enzymatisch degradiert werden können. Der pH-Wert nimmt vom extrazellulären Medium zum Lysosom hin ab. Im Lysosom liegt der pH-Wert bei 5,5 bis 3. Ein niedriger pH-Wert kann ebenfalls zur strukturellen Veränderung einer im Lysosom befindlichen Substanz führen. Eine gezielte Zerstörung der Endosomen ist jedoch möglich, um eine Substanz aus den Endosomen freizusetzen. Dazu wird die Substanz an ein Polymer gebunden, das bei einem sauren pH-Wert zerfällt. Eines der Zerfallsprodukte des Polymers sorgt für die Zerstörung des Endosoms. [18]

## **2.3. Therapie von Krebserkrankungen - Prinzipielle Methoden**

Prinzipiell stehen drei Therapiemethoden zur Verfügung: Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie. Gegen Mikrometastasen kann man bisher nur mittels Chemotherapie vorgehen.

### **2.3.1. Chemotherapie maligner Tumore [1], [4]**

Einteilung der Zytostatika nach dem Wirkmechanismus

#### **1) Antimetabolite**

Die Wirkung kommt durch die Inhibition von Enzymen zustande, die bei der Biosynthese von Nukleinsäurebasen mitwirken. Da in der S-Phase die DNS-Replikation stattfindet, werden in dieser Phase besonders viele dieser DNS-Bausteine benötigt. Sie entfalten ihre zytostatische Wirkung daher in der S-Phase des Zellzyklus. Methotrexat ist ein Antimetabolit, der die Dihydrofolatreduktase hemmt. Aus der Dihydrofolsäure entsteht der Überträger von  $^1\text{C}$ -Bausteinen Tetrahydrofolsäure, die für die Synthese von Thymidin und den Purinbasen benötigt wird. Darüberhinaus besitzt Methotrexat eine höhere Affinität zum Enzym als das natürliche Substrat. Auch Gemcitabine und 5-Fluoruracil gehören zu den Antimetaboliten.

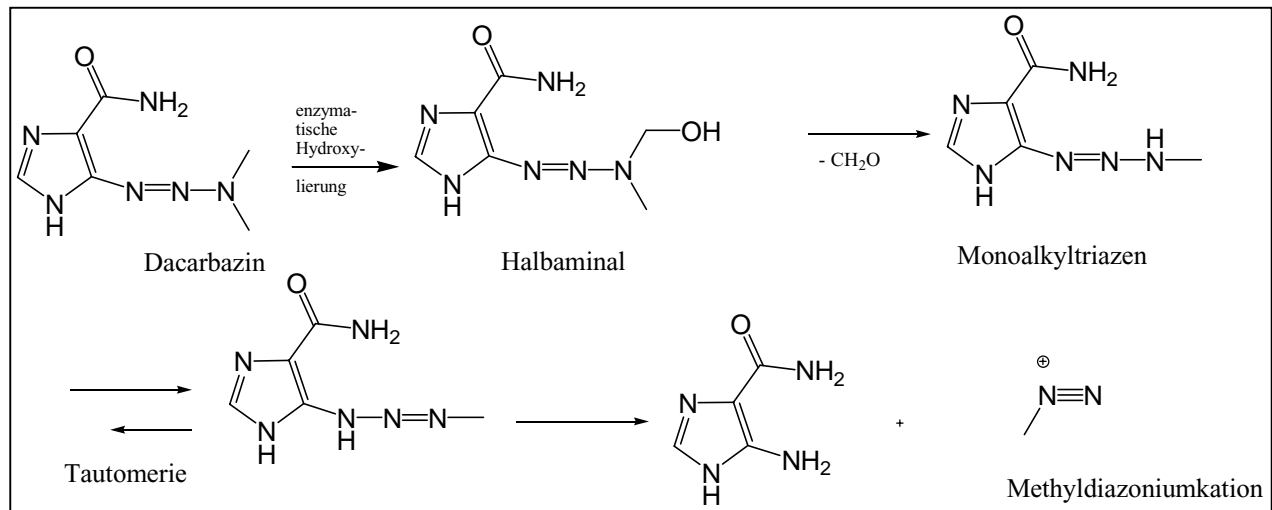
#### **2) Mitosehemmstoffe/ Spindelgifte**

Diese Zytostatika binden an Tubulinuntereinheiten und verhindern so die Ausbildung des Spindelapparates, der die Chromatiden auf die beiden neuen Zellen verteilt. Taxol verhindert die Desaggregation der Untereinheiten des Spindelapparates. In beiden Fällen werden die Zellen in der Metaphase der Mitose arretiert. Dazu gehören die Vinca-Alkaloide Vinblastin, Vincristin, und das aus der Eibe gewonnene Taxol.

#### **3) Alkylierende Zytostatika**

Sie können in verschiedenen Zellzyklusphasen kovalent mit einer Vielzahl von Molekülen wie Proteinen und Nukleinsäuren reagieren. Daher wirken sie phasenunspezifisch. Besonders bifunktionelle Alkylantien führen zur Quervernetzung zweier DNS-Stränge. Cyclophosphamid ist ein Prodrug, das durch Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen aktiviert wird. Auch Chlorambucil und Melphalan enthalten wie Cyclophosphamid eine Bischlorethylstickstoff-

Gruppierung. Durch eine intramolekulare nukleophile Substitution entsteht ein reaktives Aziridiniumkation, das dann mit elektronenreichen funktionellen Gruppen von Biomolekülen reagieren kann. Triazene und Nitrosoharnstoffderivate zählen ebenfalls zu den alkylierenden Zytostatika. Cis-Platin wirkt analog zu den alkylierenden Zytostatika. Es werden sozusagen Platinkomplexe der DNS gebildet, so dass es auch hier zu Quervernetzungen von DNS-Strängen kommt.



Dacarbazin wird mittels Cytochrom P450 in der Leber monohydroxyliert. [20] Das entstehende Halbaminal eliminiert Formaldehyd. Das entstehende Monoalkyltriazene spaltet ein Methyldiazoniumkation ab, das für die Alkylierung der DNS verantwortlich ist. [19]

#### 4) Zytostatische Antibiotika

Die zytostatisch wirksamen Antibiotika entfalten ihre Wirkung hauptsächlich in der S-Phase des Zellzyklus. Die Wirkung von Daunorubicin und Doxorubicin kommt durch die Interkalation dieser Verbindungen mit der DNS zustande. Das basische Glykopeptid Bleomycin bildet mit Eisen(II)-Kationen Chelatkomplexe, die sich wie mischfunktionelle Oxygenasen verhalten, und durch die Erzeugung von Sauerstoffradikalen DNS-Strangbrüche bewirken.

Mit der Chemotherapie werden verschiedene Ziele verfolgt, die im Folgenden näher ausgeführt werden.

##### 1. Kurative Therapie

Alle therapeutischen Maßnahmen, die zu einer vollständigen Heilung des Patienten führen sollen, bezeichnet man als kurativ. Dies setzt voraus, dass alle Tumorzellen abgetötet werden. Eine Chemotherapie als kurative Monotherapie (die einzige Therapiekomponente) ist nur bei wenigen Krebsarten indiziert. Tabelle 2 zeigt die statistisch ermittelten Erfolge einer kurativen Chemotherapie bei einigen Tumoren:

Tumorart	Heilungsrate
Chorionkarzinom	60-90
Akute Lymphatische Leukämie (Kind)	75
Burkitt Lymphom	80
Morbus Hodgkin	90
Hodenkrebs	90

Tabelle 2: Heilungsraten kurativer Chemotherapie [4]

## 2. Adjuvante Therapie

Die adjuvante Therapie stellt eine zusätzliche Maßnahme dar, die immer in Kombination mit anderen therapeutischen Maßnahmen zur Anwendung kommt. Das Ziel ist entweder die Bekämpfung der Mikrometastasen oder eine präoperative Verkleinerung des Tumors.

## 3. Palliative Therapie

Diese Art der Therapie soll der Linderung dienen. Verbesserung der Lebensqualität bzw. eine Verlängerung der Überlebenszeit sollen erreicht werden.

### 2.3.1.2. Zytostatika mit größerer Selektivität für Krebszellen

Die in der klinischen Anwendung befindlichen Zytostatika können nicht zwischen normalen Körperzellen und Krebszellen unterscheiden. Die Chemotherapeutika sind vor allem gegen stark proliferierende Zellen gerichtet. Gesunde Körperzellen, wie Darmepithelzellen und Stammzellen im Knochenmark, die sich physiologischerweise stark teilen, werden deshalb genauso wie Krebszellen geschädigt, was zu starken Nebenwirkungen führt. Dazu gehören erhöhte Infektanfälligkeit, Leukoplastie, Anämie, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall. Es treten Haarausfall, Gicht, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust und Müdigkeit auf. Daneben kommt es beim Mann zu Aspermie. Es besteht bei Zytostatika, welche die DNS verändern, die Gefahr, dass aufgrund des mutagenen Potentials dieser Verbindungen Jahre später neue Tumore entstehen. Daneben entwickeln sich häufig Resistenzen, so dass eine Wirkung des Zytostatikums ausbleibt, weil die Krebszellen es unschädlich machen oder wieder aus der Zelle transportieren. [2],[4] Daher ist es dringend erforderlich, Chemotherapeutika zu entwickeln, die selektiv die Tumorzellen schädigen, dahingegen gesunde Gewebe weitgehend verschonen. Neben der Strategie Prodrugs zu verwenden, die erst im Tumor in die Wirkform überführt werden, besteht eine weitere Möglichkeit darin, Zytostatika mit tumoraffinen Trägermolekülen zu verknüpfen. Auf diese Weise sollen die Zytostatika gezielt zum Tumor transportiert werden. Insbesondere Chlorambucil wurde an verschiedene Trägermoleküle gekoppelt. Dazu gehören Gallensäuren für den zielgerichteten Transport in Leberzellen.[21] Konjugate mehrfach ungesättigter Fettsäuren mit Chlorambucil führen zu einer erhöhten Affinität zu Lymphomen im Vergleich zu gesunden Lymphozyten.[22] Estrogene stellen potentielle Träger für Estrogenrezeptor positive Brustkrebskrankungen dar [23], und biogene Polyamine wie Spermidin besitzen eine hohe DNS-Affinität. Daher können die Polyamine als mögliche Carriermoleküle für den Transport von Chlorambucil in stark proliferierende Gewebe genutzt werden. [24] Ein Chondrosarcoma Drug

Targeting wurde möglich durch die Kopplung von Chlorambucil an quartäre Ammoniumsalze.[25] Auch Bisphosphonsäure reichert sich in Knochenkrebszellen an, was sie als Trägermoleküle interessant macht.[26] Somatostatinanaloga können als Schleppermolekül für Zytostatika genutzt werden, weil bei bestimmten Tumoren Somatostatinrezeptoren auf der Zelloberfläche überexprimiert werden. Nachdem das Konjugat an den Rezeptor gebunden hat, wird es zusammen mit diesem internalisiert. [27] Der im folgenden beschriebene Ansatz stellt eine Kombination der Trägermolekül- und Prodrugstrategie dar. Ein Konjugat, bestehend aus einem monoklonalen Antikörper und einem Enzym, erkennt ein Antigen auf der Oberfläche der Krebszelle und bindet an dieses. Danach wird ein Pharmakon verabreicht, welches durch das an den Antikörper gekoppelte Enzym in die wirksame Form überführt wird und die Tumorzelle schädigt. Dazu benötigt man allerdings Antikörper, die gezielt an den Krebszellen andocken können. [28] Statt der Konjugation von Zytostatika an Trägermoleküle gibt es Versuche eine Verbesserung der Selektivität für Tumorgewebe zu erreichen, indem Analoga dieser Chemotherapeutika hergestellt werden. Pan-Pei Chun et al. synthetisierten eine Reihe von chlorambucilanalogen Verbindungen, die neben ihrem zytostatischen Effekt auch analgetisch wirken sollten. [29] Es gibt auch eine Reihe von Forschern, die sich mit der Derivatisierung von Dacarbazin befaßt haben. Um melanomaffine Zytostatika zu entwickeln, wurden halogenierte 4-(3,3-Dimethyl-1-triazeno)chinoline hergestellt. Ihre Toxizität lag im Bereich von Dacarbazin. [30] Derry et al. fanden heraus, dass mit zunehmender Alkylkettenlänge die zytostatische Aktivität von Triazenen von Methyl nach Pentyl steigt, eine weitere Kettenverlängerung jedoch zu einem Wirkungsverlust führt. [31] Zheleva et al. konnten zeigen, dass "spin labeled" Triazene toxischer für B16-Melanomzellen sind als Dacarbazin. [32] Nanopartikel sind biokompatible Polymer-Partikel mit einer Größe im zwischen 10 und 1000 nm, die Arzneistoffe physikochemisch oder kovalent an der Oberfläche gebunden oder inkorporiert enthalten. Vor allem in der Krebstherapie könnten Nanopartikel eine Verbesserung der Therapie mit Zytostatika ermöglichen, da sie sich aufgrund des EPR-Effektes (Enhanced Permeability and Retention) in einer Reihe von soliden Tumoren anreichern. [33]

## **2.4. Melanozyten, Melanosomen und Melanin**

Das maligne Melanom spielt in dieser Arbeit eine zentrale Rolle. Zunächst soll ein Überblick über die Physiologie der Melanozyten (= pigmentbildende Zellen) gegeben werden, aus denen das maligne Melanom hervorgeht. Weil eine Reihe von Zwischenprodukten der Melaninbiosynthese toxisch für Proteine und DNS sind, findet die Melaninbiosynthese in einem speziellen, nur in Melanozyten vorkommenden, tyrosinasereichen und von einer einfachen Biomembran umgebenen Zellorganell, dem Melanosom, statt. [34] Melanosomen sind saure Zellorganellen, sie stellen in Melanozyten und auch in Melanomzellen die Zellorganellen mit dem niedrigsten pH-Wert dar. Der pH-Wert geringfügig melanisierter Melanosomen beträgt 4.2 bis 4.6, in stark melanisierten Melanosomen 3.0. [35] Im Zytosol von Melanozyten können Melanosomen unterschiedlicher Entwicklungsstadien gefunden werden. Neben der Differenzierung nach Entwicklungsstadien, kann man auch eine Untergliederung nach der Art des in den Melanosomen befindlichen Melanins vornehmen. So lassen sich eumelaninhaltige Eumelanosomen von phäomelaninhaltigen Phäomelanosomen abgrenzen. Daneben gibt es auch Neuromelanin, das in der Substantia nigra vorkommt.[36]

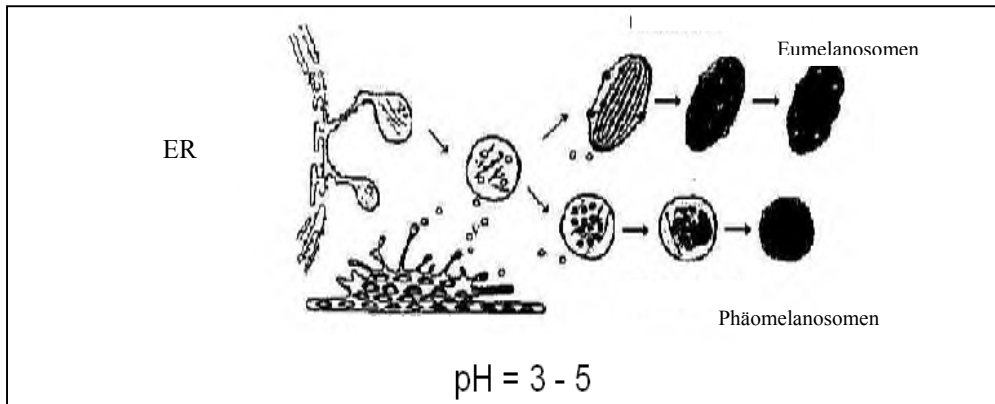
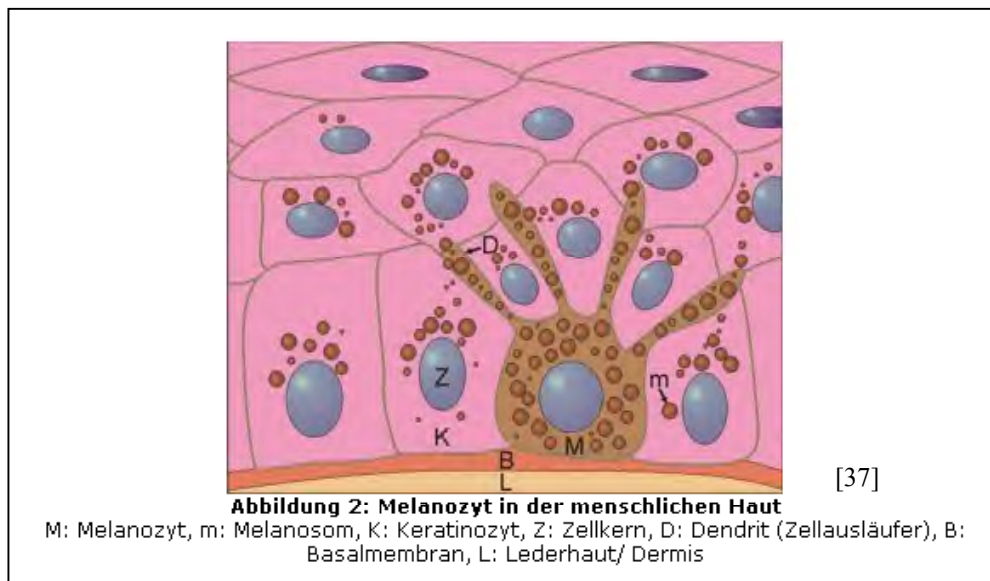


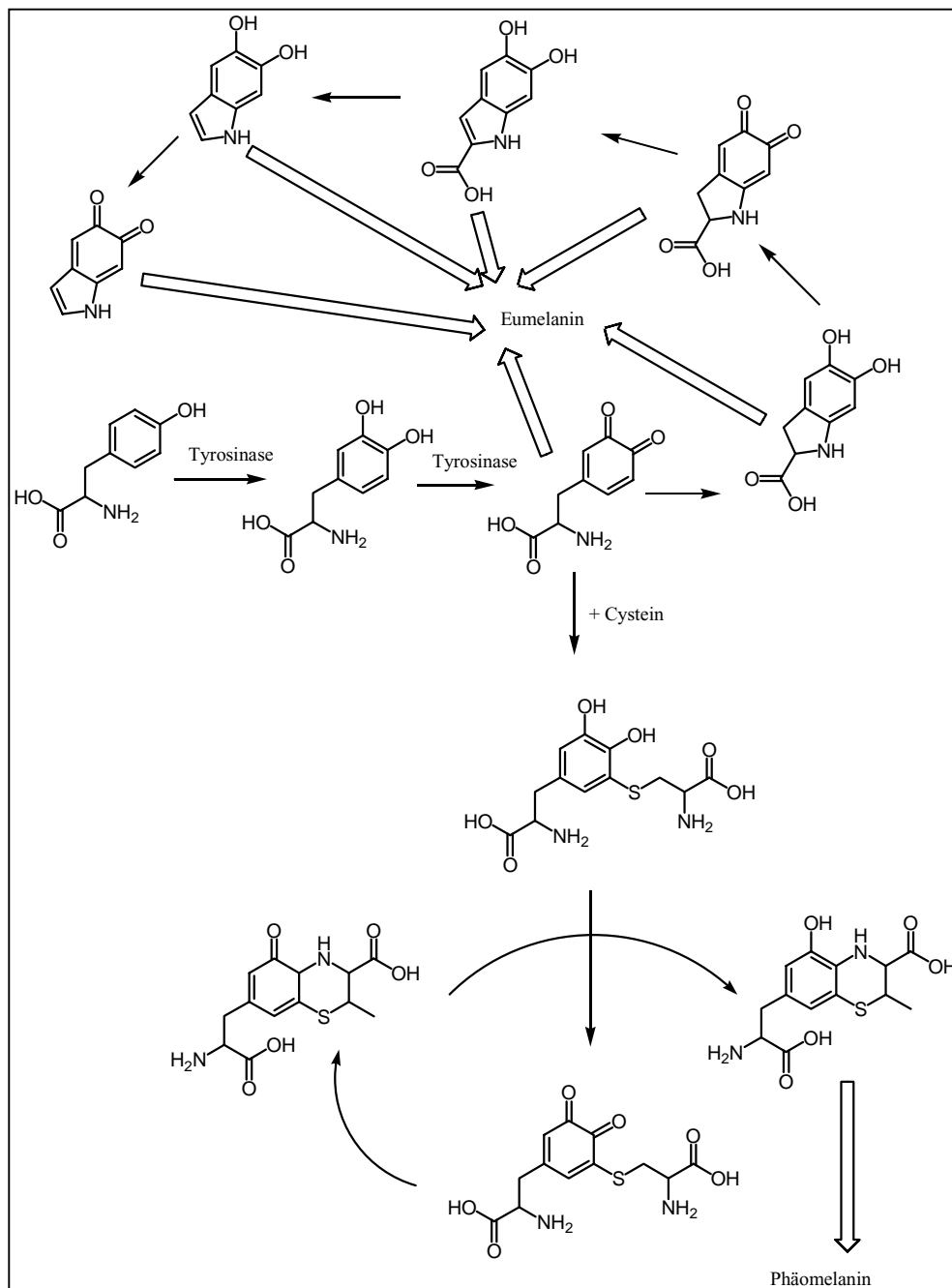
Abbildung 1: Ontogenese der Melanosomen (oben Eumelanosomen, unten Phäomelanosomen) [36]

Stufe I und Stufe II-Melanosomen, die auch als Prämelanosomen bezeichnet werden, beinhalten kein Melanin und weisen nur eine geringe Tyrosinaseaktivität auf. Stufe I Melanosomen weisen keine organisierte innere Struktur auf, wohingegen Stufe II Melanosomen eine lamellare Struktur im Inneren aufweisen. Im Golgi-Apparat werden Proteine posttranslational modifiziert, bevor sie mittels Golgi Vesikeln zu den Prämelanosomen transportiert werden. Stufe III Melanosomen sind voll funktionsfähige Organellen, in denen die Melaninsynthese stattfindet. Die Stufe IV Melanosomen enthalten viel Melanin. In ihnen findet keine Melaninsynthese mehr statt. [36] Aus den Melanosomen entstehen Melaningranula. Diese sind reich an Melanin. Die Melaningranula werden über die dendritischen Strukturen der Melanozyten in die Keratinozyten transportiert, wo sie sich um den Zellkern der Keratinozyten legen, um deren Erbgut vor UV-Strahlung zu schützen. [37] Melanin ist ein Heterobiopolymer, das durch eine Reihe von Redoxreaktionen und nachfolgenden Polymerisationsreaktionen im Melanosom aus L-Tyrosin gebildet wird. Die Tyrosinase, eine kupferhaltige Oxidoreduktase, ist das einzige Enzym, das für die Biosynthese von Melanin unbedingt erforderlich ist. L-Tyrosin wird durch die Tyrosinase zu L-DOPA oxidiert, dieses weiter zu Dopachinon. Auch dieser Schritt wird durch die Tyrosinase katalysiert. [38], [39]



[37]

Formelbild 2: Melaninbiosynthese [40]



## 2.5. Das maligne Melanom [41], [42]

Das maligne Melanom ist ein Tumor der pigmentbildenden Melanozyten, der in vielen Fällen bereits in einer frühen Phase zur Metastasierung neigt. Eine frühzeitige Diagnose ist sehr wichtig, weil insbesondere in den Stadien I und II eine vollständige Heilung erreicht werden kann, auch im Stadium III sind noch gute Heilungschancen zu verzeichnen. Aber im Stadium IV ist keine Heilung mehr zu erwarten. Rund 2000 Menschen sterben jährlich in der Bundesrepublik Deutschland an einem malignen Melanom. Es treten in Deutschland rund 10000 Fälle neu auf. Die Zahl der Menschen unter 30 Jahren, die an einem malignen Melanom erkranken, nimmt zu. Das exzessive Sonnenbaden und auch die Nutzung von Solarien tragen mit dazu bei. Hellhäutige Menschen, Menschen, die schon oft einen Sonnenbrand hatten und auch solche, die mehr als 100 melanozytäre Nävi (Leberflecken) besitzen, oder deren melanocytäre Nävi atypisch sind (erhaben, unterschiedlicher Pigmentierungsgrad), haben ein erhöhtes Risiko an einem malignen Melanom zu erkranken. Daneben gibt es auch eine familiäre Disposition. Man kann verschiedene Formen des malignen Melanoms nach dem morphologischen Erscheinungsbild voneinander unterscheiden. Superfiziell spreitende Melanome machen 70% der Melanome aus. Sie wachsen horizontal und erscheinen als unregelmäßig begrenzte, unterschiedlich pigmentierte Flecken. Noduläre Melanome neigen sehr früh zum Tiefenwachstum, wodurch sie sehr gefährlich sind. Noduläre Melanome sind gewöhnlich sehr stark pigmentiert. Das akro-lentiginöse Melanom tritt an den Händen, den Füßen oder unter den Finger- oder Zehennägeln auf. Es stellt eine Sonderform des superfiziell spreitenden Melanoms dar. Das Lentigo-Maligna-Melanom tritt im Gesicht auf. Es neigt kaum zur Metastasierung und hat eine gute Prognose. Daneben gibt es auch Schleimhautmelanome und anorektale Melanome, die bei dunkelhäutigen Personen häufiger auftreten als bei hellhäutigen Menschen. Diese sind häufig vom nodularen Typ. Es gibt maligne Melanome, insbesondere solche, bei denen der Primärtumor vom nodulären Typ ist, die kein Melanin aufweisen. Sie sind hautfarben oder rötlich. Diese malignen Melanome werden als amelanotische Melanome bezeichnet, weil sie keine Pigmente mehr enthalten. Die Erkennung solcher Melanome ist schwierig. [41] Bei der Metastasierung des malignen Melanoms werden zwei Formen voneinander unterschieden. Zum einen die subkutane Metastasierung, bei der die Metastasierung hämatogen erfolgt. Hauptsächlich Leber, ZNS und Lunge sind Orte, an denen dann neue Tumore entstehen. Die kutane Metastasierung erfolgt auf dem Lympfweg und führt dazu, dass in der Nähe des Primärtumors neue Tumore auftreten. [42]

### 2.5.1. Melanomspezifische MRT-Kontrastmittel

Es gibt bisher noch kein melanomspezifisches MRT-Kontrastmittel. Shahbazi-Gahrouei et al. beschreiben die Synthese und Testung potentieller melanomspezifischer MRT-Kontrastmittel. Dabei handelt es sich zum einen um einen Gd-DTPA-monoklonalen Antikörper und um Gd-Porphyrine. 21 % des einen Gd-Porphyrins und 28 % des anderen Gd-Porphyrins und 35% des monoklonalen Antikörpers wurden vom Tumor aufgenommen. Ob die Verbindungen intra- oder extrazellulär lokalisiert waren, wurde nicht untersucht. [43] Es wurden bisher keine  $\alpha$ -MSH-DTPA- oder  $\alpha$ -MSH-DOTA-Gadoliniumkomplexe synthetisiert.



### 2.5.2. Therapie des malignen Melanoms

Die operative Entfernung des Primärtumors spielt eine wichtige Rolle bei der Therapie. Meist wird noch eine Sicherheitsmanschette, d.h. gesundes Gewebe, mit entfernt, weil sich dort einzelne Mikrometastasen befinden könnten. Die Größe des Sicherheitsabstandes hängt von der Tumordicke ab. Wenn bereits Lymphknoten befallen sind, dann werden diese ebenfalls operativ entfernt. Im Stadium I wird lediglich eine Entfernung des Primärtumors empfohlen. Ab Stadium II sollte neben der operativen Exzision des Primärtumors auch eine Immuntherapie mit Interferon  $\alpha$  durchgeführt. Wenn in Stadium III durch operative Maßnahmen eine klinische Tumorfreiheit erreicht werden kann, dann wird neben Interferon  $\alpha$  auch eine Monochemotherapie durchgeführt. In erster Linie kommt das gut verträgliche Dacarbazin zum Einsatz. Es muss intravenös appliziert werden. Außerdem wird eine antiemetische Prophylaxe durchgeführt, weil es starke Übelkeit hervorruft. Daneben wird häufig Temozolomid verwendet, das Ähnlichkeit mit Dacarbazin besitzt. Der Vorteil gegenüber Dacarbazin liegt darin, dass Temozolomid auch oral appliziert werden kann und ZNS-gängig ist. Dacarbazin kann also nicht zur Therapie bei Metastasierung im ZNS verwendet werden, weil es die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann. Wenn im Stadium III keine klinische Tumorfreiheit erreicht werden kann oder im Stadium IV wird eine palliative Chemotherapie durchgeführt. [41]

Dacarbazin ist die wirksamste Monosubstanz mit einer Remissionsrate von 20 %. Zum Einsatz kommt auch Fotemustin, ein Nitrosoharnstoffderivat, bei dem partielle Remissionsraten von bis zu 30% vorkommen. Häufig werden mehrerer Chemotherapeutika miteinander kombiniert, um eine bessere Ansprechrate zu erzielen. Es gibt diverse Therapieschemata, die festlegen, welches Zytostatikum zu welchem Zeitpunkt in welcher Dosierung appliziert wird. [44], [45]

### 2.5.3. Strategien zur Verbesserung der Therapie des metastasierenden malignen Melanoms

Dacarbazin und Nitrosoharnstoffderivate sind die wirksamsten Zytostatika bei der Therapie des metastasierenden malignen Melanoms. Jedoch liegt die Ansprechrate nur bei 10 bis 20%. [45] Wegen der geringen Effizienz der systemisch applizierten Zytostatika Dacarbazin und einiger Nitrosoharnstoffderivate bei der Behandlung des metastasierenden malignen Melanoms, ist die Suche nach besser wirksamen Zytostatika ein erstrebenswertes Ziel. Es wurden mehrere Versuche beschrieben, dieses Ziel zu erreichen. Die Entwicklung von Prodrugs, die nach der Bioaktivierung in Melanomzellen, ihre antiproliferative Wirkung entfalten, stellt eines der Konzepte dar. In diesem Zusammenhang wurde von Jordan et al. der Versuch unternommen, ein durch die melanosomale Tyrosinase aktiviertes Prodrug zu entwickeln. Sie synthetisierten 4-(Bis(2-chloroethyl)amino)phenyl-4-hydroxyphenethylcarbamate, das durch die Tyrosinase in das wirksame 4-(Bis(2-chloroethyl)amino)phenol überführt wird. [46] Ein weiteres Prodrug stellt 4-S-Cysteaminylphenol (4-CAP) dar. 4-CAP wird Tyrosinase-katalysiert zu einem ortho-Chinon oxidiert, das dann zu Dihydro-1,4-benzothiazin-6,7-thion weiterreagiert. Letzteres kann mit sulfhydrylgruppenhaltigen Proteinen reagieren. Inoue et al. zeigten, dass die Toxizität von 4-CAP mit der Tyrosinaseaktivität korreliert. [47] Morrison *et al.* untersuchten die melanomspezifische Wirkung von 2,4-Dihydroxyphenylalanin, welches durch die Tyrosinase zu 2,4,5-Trihydroxyphenylalanin oxidiert wird. Durch die Inhibition der Tyrosinase kam es zu einem

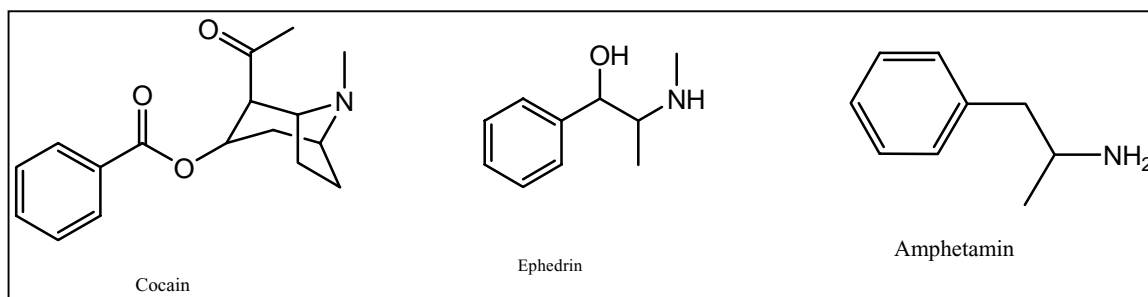
Verlust der zytostatischen Wirkung dieses Prodrugs. [48] Neben der Prodrugstrategie zur Lösung des Problems, wurden Versuche eines Tumortargetings unternommen. Trägermoleküle wie  $\alpha$ -MSH-Agonisten [49], [50] wurden mit Zytostatika verknüpft, um so durch die Trägermoleküle die Zytostatika gezielt zum Wirkort zu transportieren. Die mit  $\alpha$ -MSH-Konjugaten erzielten in-vitro-Resultate ließen sich jedoch in vivo nicht bestätigen. Außerdem bewirkten die Konjugate eine Rezeptorherunterregulation, was eine weitere Anreicherung im Melanom verhindert. [49], [50]

## 2.6. Melanin - Arzneistoff/Chemikalien-Interaktionen

Eine Reihe von Chemikalien und Arzneistoffen besitzt eine bemerkenswerte Melaninaffinität. Es wird angenommen, dass Melanin als eine Art Filter für Fremdstoffe fungiert und somit die Zelle vor dem Einfluss von Chemikalien schützt oder aber die Funktion eines Speichers für Stoffe übernimmt, der die gebundenen Stoffe nach und nach abgibt. [51] Melanin ist ein Polyanion. [52] Daher verwundert es nicht, dass besonders Kationen und schwache Basen, die in protonierter Form ebenfalls Kationen darstellen, besonders stark an Melanin gebunden werden. [53], [54], [55]  $^1\text{H}$ -NMR-Untersuchungen zeigen, dass mehr als 2(-)-Ephedrinmoleküle mit einer Indoluntereinheit des Melanins interagieren, was die gute Bindungskapazität dieses Arzneistoffes erklärt. [56]

Substanz	$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>(+)Amphetamin</b>	<b>28</b>
<b>Cocain</b>	<b>89</b>
<b>(-)-Ephedrin</b>	<b>14</b>

Tabelle 3: Melaninaffinität einiger schwacher Basen [56]



Formelbild 3: Strukturformeln der in der Tabelle erwähnten schwachen Basen [57]

Eine Reihe von Stoffen ist in der Lage, die physiologischen Vorgänge im Melanosom zu beeinflussen. Dazu gehören beispielsweise Chloroquin und Concanamycin A, ein selektiver VAT-Protonenpumpenhemmer. Abgesehen von Concanamycin A handelt es sich bei diesen Stoffen um schwache Basen. Sie führen zur Anhebung und Neutralisation des intramelanosomalen pH-Wertes. Dies hat zu Folge, dass die Tyrosinaseaktivität steigt, da das pH-Optimum dieses Enzyms bei pH = 6,8 liegt. Damit kommt es zur vermehrten Synthese von Melanin. [58], [59]

### 2.6.1 Melanomaffinität der *N*-[2-(Dialkylamino)ethyl]benzamide

Radioiodierte *N*-[2-(Dialkylamino)ethyl]benzamide werden in der Nuklearmedizin verwendet, um Melanommetastasen bildgebend darzustellen.

Ein Beleg für die sehr hohe Anreicherung der Benzamide in Melanomen war ein Experiment, bei dem Versuchstieren mit einem transplantierten Melanom neben der immer gleichen Menge des radioiodierten Benzamides {*N*-(2-diethylaminoethyl)-4-[<sup>131</sup>I]iod}benzamid eine zunehmend größere Dosis des gleichen, aber nicht radioaktiv markierten Benzamides verabreicht wurde. Bei der Untersuchung der Organverteilung des radioaktiven Benzamides zeigte sich eine unverändert hohe Melanomanreicherung. Das nicht radioaktive Benzamid sollte mit dem radioiodierten Benzamid um die Bindungsstellen im Melanom konkurrieren. Da jedoch die im Melanom gefundene Menge des radioaktiven Benzamides unabhängig von der Konzentration des nicht radioaktiven Benzamides war, läßt sich darauf schließen, dass sehr viele Bindungsstellen für Benzamide im Melanom vorhanden sein müssen. Siehe dazu auch Tabelle 4. [60]

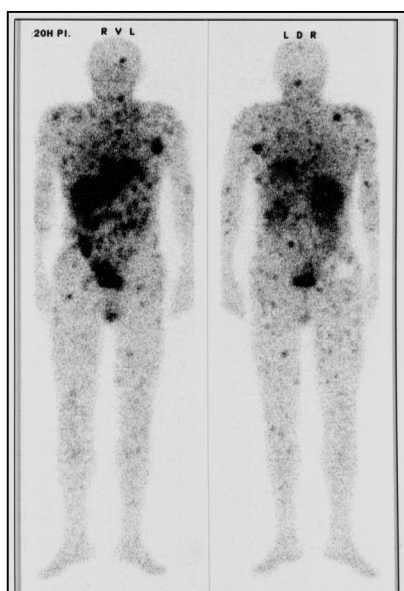
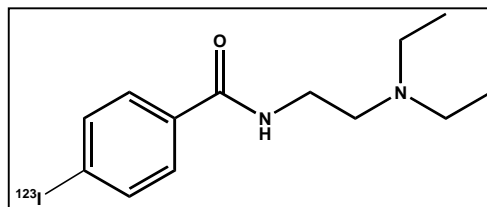


Abbildung 4: Melanomszintigramm



Formelbild 4: [<sup>123</sup>I]-BZA

Injizierte Dosis ( $\mu\text{M}$ nicht radioaktives BZA/ Maus)	Melanomanreicherung des radioaktiven BZA [% ID/g]	
	1 h	6 h
	nach der Injektion	
<b><math>3,9 \cdot 10^{-7}</math></b>	<b>5,67</b>	<b>9,32</b>
<b><math>2 \cdot 10^{-3}</math></b>	<b>10,02</b>	<b>15,47</b>
<b>1,7</b>	<b>11,60</b>	<b>14,58</b>

Tabelle 4: Einfluß zunehmender Mengen nicht radioaktiven Benzamides auf die Anreicherung des radioiodierten Benzamides. [60]

Man dachte, dass die Anreicherung der *N*-[2-(Dialkylamino)ethyl]benzamide mit ihrer Affinität zu  $\sigma$ -Rezeptoren zusammenhängt. Eisenhut et al. zeigten jedoch, dass es keine Korrelation zwischen der Affinität der Benzamide zu  $\sigma$ -Rezeptoren und ihrer Anreicherung gibt. Die hochanreichernden Benzamide weisen sogar die geringste  $\sigma$ -Rezeptoraffinität auf. Als Bindungsstelle wurden Melanosomen identifiziert, wobei die Bindungskapazität kaum sättigbar ist. Eisenhut et al. kamen zu dem Schluß, dass die Aufnahme der Benzamide in B16-Melanomzellen nicht durch einen spezifischen Aufnahmemechanismus bewirkt wird, sondern durch passive Diffusion. Darüberhinaus beschreiben Eisenhut et al., dass für andere schwache Basen, die sich ebenfalls in melaninhaltigen Zellen anreichern, ähnliche Charakteristika entdeckt worden sind. Die schnelle Clearance der Benzamide aus anderen Geweben im Vergleich zu den B16-Melanomen macht sie zu geeigneten Diagnostika für Melanommetastasen. [60] Iod-123-IBZM reichert sich in malignen melanotischen Melanomen an, nicht aber in amelanotischen Melanomen. [61] Dittmann et al. kamen zu dem Schluß, dass die Anreicherung der Benzamidderivate mit der Melaninsynthese, die durch die Erhöhung des extrazellulären pH-Wertes stimuliert wird, im Zusammenhang steht. [62]

Die Anreicherung scheint Larisch et al. zufolge an das intrazelluläre Melanin gebunden zu sein. [63] Labarre et al. berichteten, dass die Anreicherung von [ $^{125}$ I]BZA von der Melaninkonzentration der Melanomzellen abhängig war und die Anreicherung innerhalb der ersten fünf Minuten sehr rasch erfolgte. Bei der Bindung an das Melanin spielen ionische Wechselwirkungen eine Rolle; bei physiologischem pH-Wert liegt dieses Benzamid in protonierter Form vor. Desweiteren spielen auch hydrophobe Wechselwirkungen eine Rolle. Labarre et al. stellten auch eine pH-Abhängigkeit der Melanin-Benzamid-Interaktion fest. Die Anreicherung der Benzamide erfolgt nur in melanotischen Melanomen, nicht dahingegen in amelanotischen Melanomen. [64]

### 3. Aufgabenstellung

Da die bisher für die Therapie des metastasierenden malignen Melanoms zur Verfügung stehenden Zytostatika nur sehr geringe Effizienz besitzen, ist es notwendig, Strategien zu entwickeln, die zur Verbesserung der chemotherapeutischen Behandlung von Melanompatienten beitragen. Eine Strategie stellt die Verknüpfung zytostatisch aktiver Strukturelemente mit Trägersubstanzen dar, die sich selektiv in Tumorgeweben anreichern. Von *N*-[2-(Dialkylamino)ethyl]benzamidin ist bekannt, dass sie eine hohe Melanomaffinität aufweisen. Besonders die Tatsache, dass es nur eine geringe Sättigungstendenz gibt, macht diese Substanzklasse als niedermolekulare Träger für Zytostatika interessant. Zunächst wurden daher zytostatisch aktive Benzamidderivate synthetisiert. Zwei der Konjugate sollten auf ihre Fähigkeit, sich in Melanomen anzureichern, geprüft werden. Dazu wurden in vitro und in vivo Versuche durchgeführt.

In einem in-vitro Zytotoxizitätstest sollten anschließend die  $IC_{50}$ -Werte der Verbindungen für B16 Melanomzellen ermittelt und mit den für Dacarbazin und Chlorambucil erhaltenen Werten verglichen werden. Als Kontrollzelllinien dienten HeLa und Morris Hepatom Zellen. Aufgrund der Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchungen wurde die Zielstellung um die Aufklärung des Wirkmechanismus der Benzamidzytostatika und des Anreicherungsmechanismus der Benzamide im Melanom erweitert. Auf diese Weise sollten die gefundenen  $IC_{50}$ -Werte erklärt werden.

Außerdem wurde der Versuch unternommen, durch Konjugation von Gadoliniumchelatoren mit *N*-[2-(Diethylamino)ethyl]benzamidin, melanomspezifische MRT-Kontrastmittel zu erhalten. Die Benzamide als Träger für MRT-Kontrastmittel und Zytostatika zu nutzen, wurde bisher noch nicht unternommen.

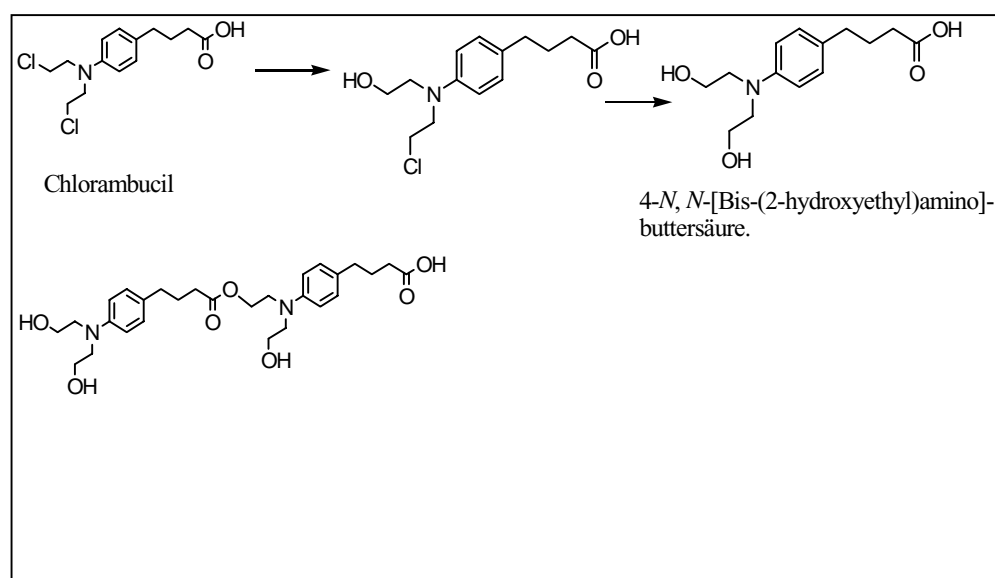
## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Chemie – Synthesen/Reaktivität/physiokochemische Eigenschaften

#### 4.1.1. Chlorambucil-Benzamid-Konjugate

##### 4.1.1.1. Stabilität der Zytostatika mit einer [Bis-(2-chlorethyl)amino]-Funktion

Anfängliche Probleme bei der Isolierung der Chlorambucil-Konjugate erforderten Stabilitätsuntersuchungen von Chlorambucil. Die Halbwertszeit von Chlorambucil liegt bei 37°C und pH = 6,8 bei 18 Minuten. Haupthydrolyseprodukt ist 4-[Bis-(2-hydroxyethyl)amino]-buttersäure. [65]



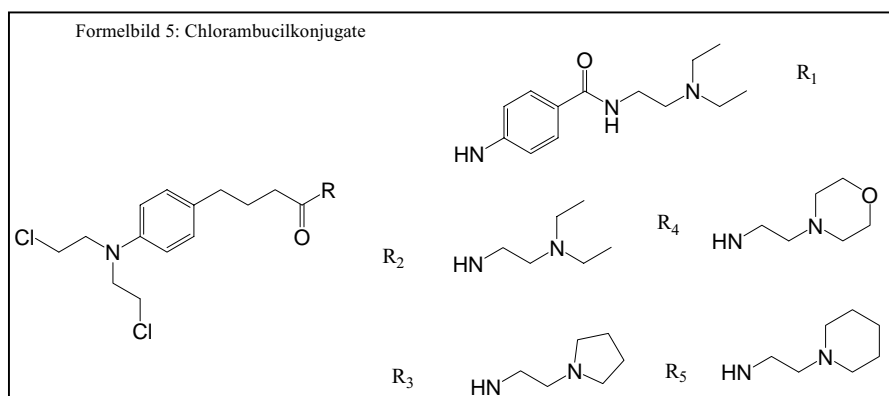
Reaktionsschema 1: Hydrolyse von Chlorambucil. [65]

Zwischen pH 4,5 und 10 ist die Hydrolyserate am größten. In wässrigen Lösungen liegt das Stabilitätsoptimum bei pH >2. In DMSO ist Chlorambucil mindestens 24 Stunden lang stabil. [66]

##### 4.1.1.2. Synthese der Chlorambucilkonjugate

Es wurden mehrere Konjugationsmethoden ausprobiert, um Procainamid an Chlorambucil zu koppeln. Auf diese Weise sollte die für die Synthese aller Chlorambucilkonjugate geeignetste Methode gefunden werden. Chlorambucil ist eine chemisch sehr instabile Verbindung. Daher musste die Bildung des Chlorambucilsäurechlorides unter schonenden Reaktionsbedingungen durchgeführt werden. Bei 4°C bildet sich unter Inertgas in Gegenwart von Thionylchlorid [25] oder Oxalylchlorid [67] innerhalb von 24 Stunden das Säurechlorid des Chlorambucils, das mit dem entsprechenden Amin zu dem gewünschten Konjugat umgesetzt werden konnte. Allerdings war die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches schwierig. Daher wurde mittels DCC in An- und

Abwesenheit von HOBt [25] und auch mittels HATU versucht, eine Kopplung durchzuführen. Dabei erwies sich die Konjugation mit HATU [68] als die Methode der Wahl, weil die Abtrennung des gewünschten Chlorambucilkonjugates von den Edukten am einfachsten war, denn bei der Verwendung von DCC entstanden Nebenprodukte, bei der Verwendung von HATU jedoch nicht. Insgesamt wurden fünf neue Chlorambucil-Benzamidkonjugate dargestellt. Nach einer 30 minütigen Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter Vermeidung von Wärmezufuhr am Ölpumpenvakuum evaporiert. Bei der Zufuhr von Wärme zersetzten sich die Produkte. Die Konjugation von Diethylaminoethylamin, Pyrrolidinoethylamin, Morpholinoethylamin und Piperidinoethylamin erfolgte in analoger Weise. Ein Problem stellte die säulenchromatografische Aufreinigung dar. Wegen der großen Reaktivität der Verbindungen musste die Kontaktzeit mit dem Kieselgel so kurz wie möglich gehalten werden. Auf der anderen Seite war es erforderlich, eine gute Abtrennung von den Edukten zu erzielen. Es konnte ein geeignetes Lösungsmittelgemisch gefunden werden, mit dem das Produkt sehr rasch eluiert werden konnte, ohne dass die Trennschärfe vermindert wurde. Die Kristallisation erwies sich - vom Chlorambucil-Procaïnamid-Konjugat abgesehen - als schwierig. Anfänglich fiel bei der Verwendung von Ethylacetat, Dichlormethan und Petrolether als Lösungsmittelgemisch für die Kristallisation noch ein gelbes Öl aus, bei dem es sich um eine Mischung aus dem Benzamidzytostatikum und dem nicht umgesetzten aliphatischen Amin handelte. Durch Kühlen und Anreiben mit dem Glasstab gelang die Kristallisation. Die Ausbeute an elementaranalytisch reinen Produkten lag bei 10%. Das Diethylaminoethyl-Konjugat kristallisierte auch nach der vollständigen Abtrennung des Öles nicht. Die Konjugate erwiesen sich allesamt als sehr lipophil, erkennbar an der sehr guten Löslichkeit in Chloroform, Dichlormethan, Diethylether und an den sehr großen Retentionszeiten bei der RP<sub>18</sub>-HPLC. Bei einem Gradienten von 0 auf 100% Methanol in 30 Minuten wurden die Konjugate erst nach 34 Minuten eluiert. Auch in Ethanol, Ethylacetat, Methanol und DMSO waren die Konjugate gut löslich. In Wasser lösten sie sich nicht. In verdünnten Säuren zeigten sie eine geringe Löslichkeit. Dort waren sie für mehrere Stunden stabil. Im basischen Milieu hingegen waren sie instabil. In Petrolether und n-Hexan waren sie unlöslich. Eine Aufbewahrung der Konjugate im Kühlschrank war erforderlich.



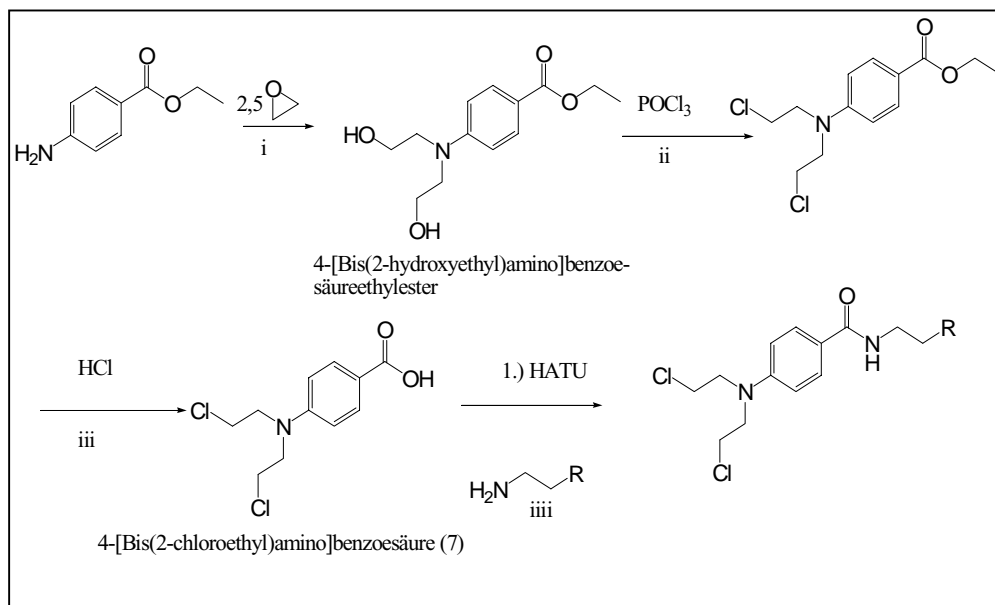
- R1 4-(4-{4-[Bis(2-chlorethyl)amino]phenyl}butanamido)-N-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid (1)  
 R2 4-{4-[Bis(2-chlorethyl)amino]phenyl}-N-[2-(diethylamino)ethyl]butanamid (2)  
 R3 4-{4-[Bis(2-chlorethyl)amino]phenyl}-N-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl]butanamid (3)  
 R4 4-{4-[Bis(2-chlorethyl)amino]phenyl}-N-[2-(morpholino-1-yl)ethyl]butanamid (5)  
 R5 4-{4-[Bis(2-chlorethyl)amino]phenyl}-N-[2-(piperidin-1-yl)ethyl]butanamid (4)

#### 4.1.1.3. Radioiodierung von **Chlorambucil** und den Benzamidkonjugaten **1** und **2**

Haberkorn et al. beschreiben die Methode zur Radioiodierung. [69] Die zu markierende Verbindung wurde in TFA gelöst und zunächst mit Thalliumtrifluoracetat zur Reaktion gebracht. Nach einer 10 minütigen Reaktionszeit wurde eine wäßrige Natriumiodidlösung zugegeben. Andere Iodierungsmethoden lieferten nicht das gewünschte Produkt. Die Aufreinigung erfolgte mittels HPLC.

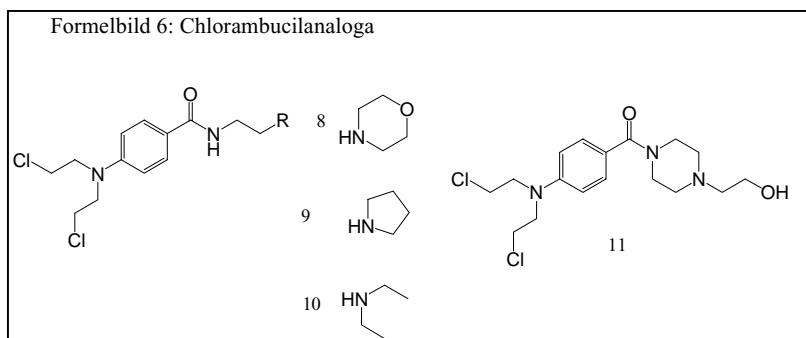
#### 4.1.2. Benzamidzytostatika mit [Bis- (2-chlorethyl)amino]-funktion

Die Synthese von Benzamidzytostatika mit größerer chemischer Stabilität und größerer struktureller Ähnlichkeit zu den in der Melanomszintigrafie verwendeten Benzamiden soll im Folgenden beschrieben werden. Man kann chlorambucilanaloga Benzamidzytostatika durch die Derivatisierung der 4-Aminofunktion erhalten. Durch die Reaktion von Ethylenoxid mit 4-Aminobenzoesäureethylester in 25%iger Essigsäure im Autoklaven gelang die Einführung einer 4-[Bis(2-hydroxyethyl)]-funktion in das Molekül. [29], [70], [71] Die Esterfunktion diente als Schutzgruppe, um eine Reaktion des Ethylenoxids mit der Carboxylgruppe zu vermeiden. Die Hydroxylgruppen wurden mittels  $\text{POCl}_3$  durch Chloratome substituiert. [29], [70], [71] Die nachfolgende saure Hydrolyse des Substitutionsproduktes lieferte die freie Säure [29], an die dann die entsprechenden *N,N*-Dialkylaminoethylamine durch das Kopplungsreagenzium HATU ankonjugiert wurden.



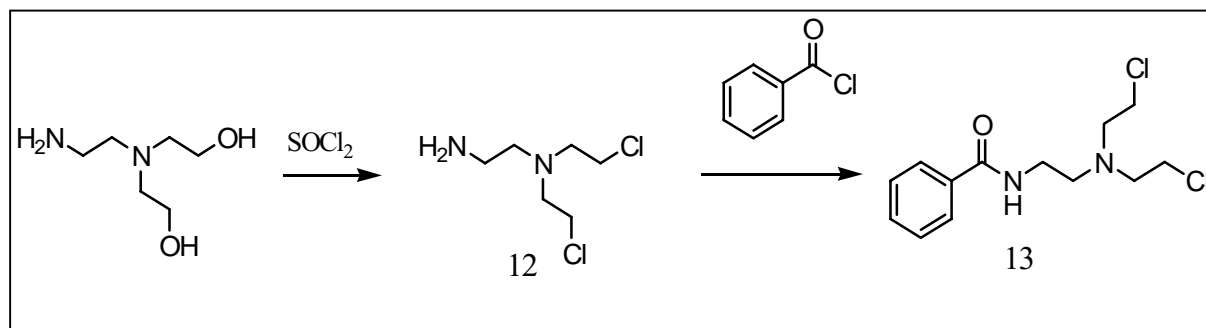
Reaktionsschema 2: Synthese der Chlorambucilanaloga: i: 25%ige Essigsäure, erst  $-20^\circ\text{C}$ , dann RT im Autoklaven; ii: 30 Minuten Rückfluß; iii: 2 Stunden Rückfluß; iiiii: 30 Minuten, Acetonitril, RT





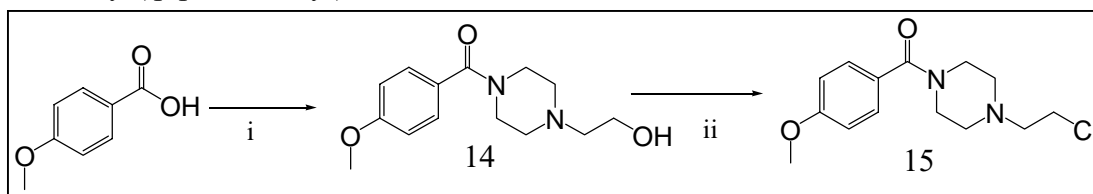
- 8 4-[Bis(2-chloroethyl)amino]-*N*-(2-morpholinoethyl)benzamid  
 9 4-[Bis(2-chloroethyl)amino]-*N*-(2-pyrrolidinoethyl)benzamid  
 10 4-[Bis(2-chloroethyl)amino]-*N*-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid [29]  
 11 {4-[Bis-(2-chloro-ethyl)-amino]-phenyl}-[4-(2-hydroxy-ethyl)-piperazin-1-yl]-methanon

Diese Benzamide waren wie die Benzamidkonjugate allesamt sehr lipophil. Sie lösten sich in den gleichen Lösungsmitteln wie die Chlorambucilkonjugate, allerdings wiesen sie etwas geringere Retentionszeiten und  $R_f$ -Werte als diese auf. Ihre chemische Stabilität war dahingegen größer, wohl wegen der elektronenziehenden Wirkung der zur zytostatisch aktiven Gruppe paraständigen, elektronenziehenden Carbonylfunktion, welche die Elektronendichte am Stickstoff herabsetzt und damit die Wahrscheinlichkeit für die Bildung des Aziridiniumkations verringert. Die Kristallisation war auch hier aufwendig. Es musste mehrmals ein gelbes Öl (=Mischung aus dem Produkt und dem aliphatischen Diamin) abgetrennt werden, bevor die Kristallisation gelang. Das Diethylaminoethylamin-Derivat kristallisierte auch nach Abtrennung des gelben Öles nicht. Eine weitere Möglichkeit der Derivatisierung der Benzamide mit einer Bischlorethylaminofunktion besteht darin, dass man die *N,N*-Diethylaminofunktion durch eine *N,N*-Bis-[(2-chlorethyl)amino]-Gruppe ersetzt. Die Synthese erfolgte in einer zweistufigen Reaktion. Im ersten Reaktionsschritt wurde *N,N*-Bis-(2-hydroxyethyl)ethylendiamin mittels Thionylchlorid 7 Tage lang bei 4°C umgesetzt. [72] Das Hydrochlorid wurde in die freie Base überführt und diese mit Benzoylchlorid zur Reaktion gebracht. Allerdings erwies sich das Produkt, *N*-{2-[Bis-(2-chloro-ethyl)-amino]-ethyl}benzamid **13**, als sehr instabil. Eine säulenchromatografische Auftrennung war nicht möglich, genauso wie eine Aufreinigung mittels präparativer HPLC. Der Versuch der Umkristallisation mit verschiedenen Lösungsmitteln führte nicht zur Isolierung des gewünschten Reinproduktes.



Reaktionsschema 3: Synthese von *N*-{2-[Bis-(2-chloro-ethyl)-amino]-ethyl}-benzamid **13**

Durch die Konjugation von 4-Methoxybenzoesäure an *N*-(2-Hydroxyethyl)piperazin und nachfolgende Substitution der Hydroxylgruppe wurde das zytostatisch inaktive 4-Methoxy-*N*-(2-(4-(2-chlorethyl)-piperazin-1-yl)benzamid **15** erhalten.

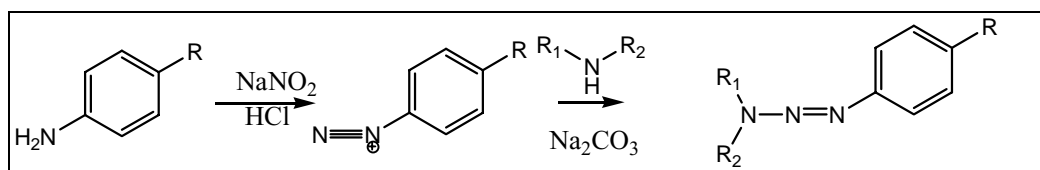


Reaktionsschema 4: Synthese von 4-Methoxy-*N*-(2-(4-(2-chlorethyl)-piperazin-1-yl)benzamid  
i: 1) 1 Äqu. HATU, 2) 1 Äqu. *N*-(2-Hydroxyethyl)piperazin; Acetonitril, 1 h, RT  
ii: DCM, Thionylchlorid, 45 min. Rückfluss

Insgesamt wurden 5 neue Chlorambucilanaloge synthetisiert.

#### 4.1.3. Benzamide mit einer Triazenfunktion

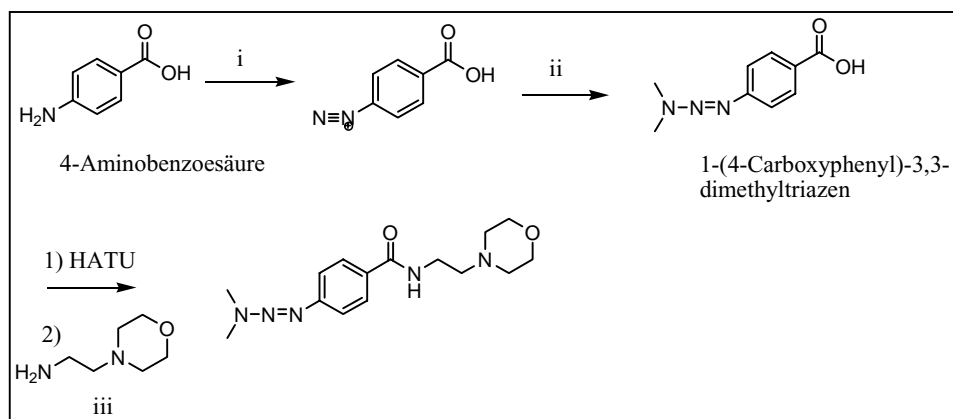
Dacarbazin zählt zum Goldstandard bei der Therapie des metastasierenden malignen Melanoms. Für die Wirkung verantwortlich ist allerdings nur die Triazengruppierung. [4] Daher wurde eine Reihe von Dacarbazinanaloga synthetisiert, die eine Benzamidstruktur und eine Triazenfunktion besitzen. Triazene lassen sich aus primären aromatischen Aminen herstellen. Dazu wird das primäre aromatische Amin diazotiert und nachfolgend mit einem sekundären aliphatischen Amin umgesetzt. [73] Als Benzamide mit einer primären aromatischen Aminofunktion wurden Metoclopramid und Procainamid ausgewählt. Die aromatische Aminogruppe von Procainamid oder von Metoclopramid wurde in 3 N HCl bei 0°C mittels eines Äquivalentes Natriumnitrit diazotiert. Das Diazoniumsalz wurde nachfolgend in einer basisch-wässrigen Lösung mit einem sekundären aliphatischen Amin umgesetzt, um das entsprechende Triazeno-Benzamid zu erhalten. Wichtig dabei ist, dass die HCl komplett neutralisiert wird, da die Bildung des Triazens eine Gleichgewichtsreaktion darstellt, bei der das Gleichgewicht im sauren Milieu sehr stark auf der Seite der Edukte liegt. Daher wurde die Säure mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> neutralisiert und zusätzlich mit einem 30%igen Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Überschuss versetzt, damit das Milieu basisch bleibt. [74]



Reaktionsschema 5: Triazensynthese.

Um Triazene mit Benzamidstruktur zu synthetisieren, die statt Diethylaminoethylamin Morpholinoethylamin oder Piperidinoethylamin enthalten, wurde der folgende Reaktionsweg gewählt. 4-Aminobenzoesäure wurde in Acetonitril/TFA unter Inertgas bei -5°C mittels Isopentylnitrit 1 Stunde lang diazotiert. Das Diazoniumsalz wurde bei -80°C aus der Lösung durch die Zugabe von Diethylether ausgefällt und danach ohne weitere Aufreinigung mit dem entsprechenden sekundären Amin zur Reaktion gebracht. Dabei ist darauf zu achten, dass das Diazoniumsalz nie trocken wird. [75] Die Kopplung an das Dialkylaminoethylamin erfolgte

mittels HATU. 4-Amino-3-chlor-2-methoxy-benzoesäure läßt sich wie 4-Aminobenzoesäure diazotieren und danach weiter zu Verbindung **20** umsetzen.



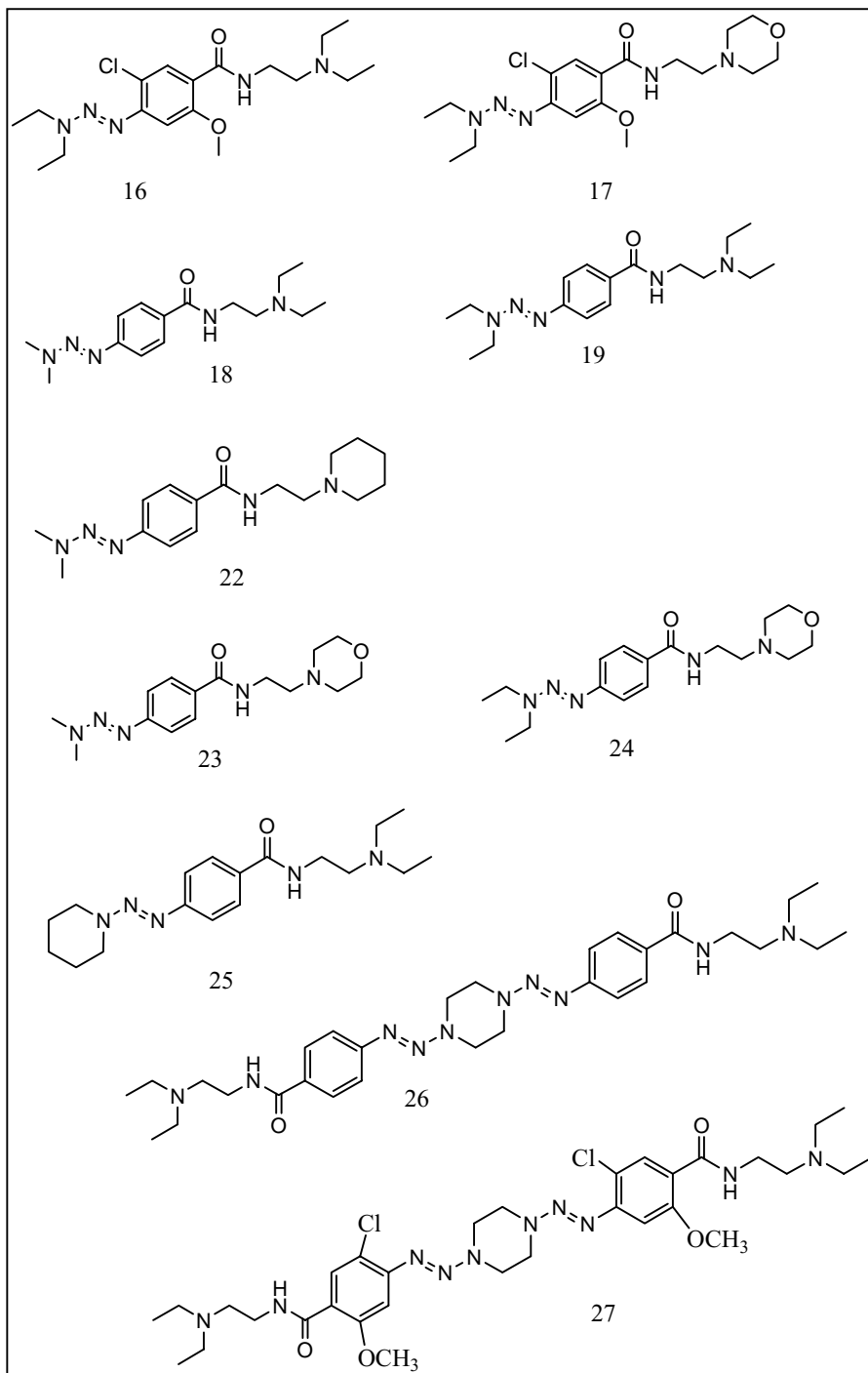
Reaktionsschema 6: Triazensynthese

- i Isopentylnitrit, TFA, Acetonitril, -15°C, 1 Stunde
- ii Dimethylamin, Dichlormethan, 0°C, 30 Minuten
- iii Acetonitril, 1 Stunde, Raumtemperatur

Die Triazene sind farblose bis schwachgelbe, lipophile und säurelabile [71; Literatur bezieht sich nur auf die Säurelabilität] Verbindungen. Die Kristallisation gelang außer bei einem Triazen bei allen anderen.

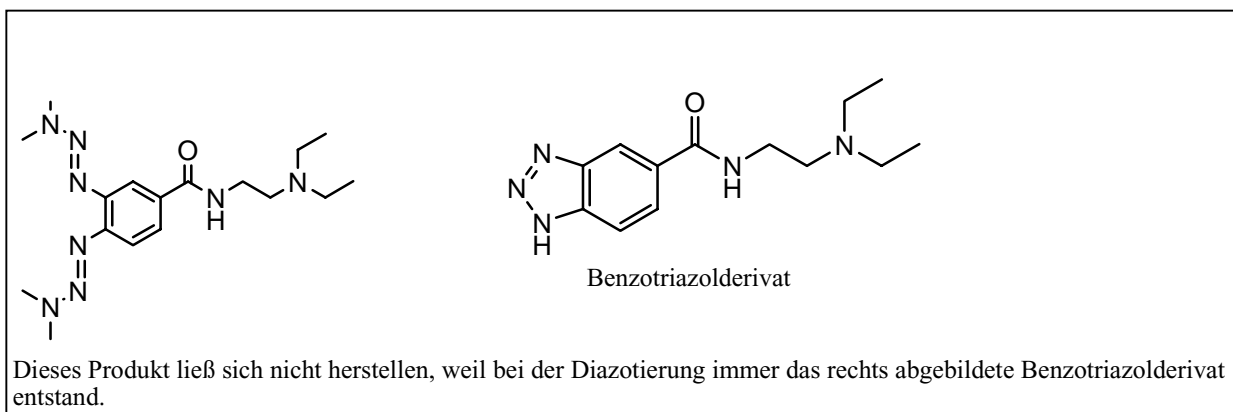
Folgende neue Triazeno-Benzamide wurden synthetisiert.

- 5-Chloro-N-[2-(diethylamino)ethyl]-4-(*N,N*-diethyltriazeno)-2-methoxybenzamid (16)
- 5-Chloro-N-[2-(morpholinoethylamino)]-4-(*N,N*-diethyltriazeno)-2-methoxybenzamid (17)
- N-[2-(Diethylamino)ethyl]-4-(*N,N*-dimethyltriazeno)benzamid (18)
- N-[2-(Diethylamino)ethyl]-4-(*N,N*-diethyltriazeno)benzamid (19)
- N-[2-(Piperidinoethylamino)]-4-(*N,N*-dimethyltriazeno)benzamid (22)
- N-[2-(Piperidinoethylamino)]-4-(*N,N*-dimethyltriazeno)benzamid (22)
- N-(2-(Morpholinoethylamino))-4-(*N,N*-dimethyltriazeno)benzamid (23)
- N-[2-(Morpholinoethylamino)]-4-(*N,N*-diethyltriazeno)benzamid (24)
- N-[2-(Diethylamino)ethyl]-4-(*N*-piperidinotriazeno)benzamid (25)
- N,N'*-Bis{4-diazenyl-*N*-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid}piperazin (26)
- N,N'*-Bis{4-diazenyl-*N*-[2-(diethylamino)ethyl]-5-chlor-2-methoxy-benzamid}piperazin (27)



Formelbild 7: Die Triazenobenzamide.

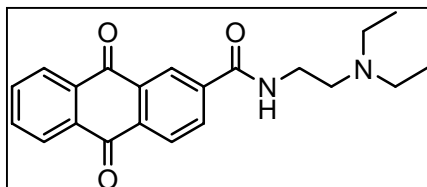
Ausgehend von 3,4-Diamino-*N*-[2-(diethylamino)ethyl]-benzamid sollte ein weiteres Bis-Triazen synthetisiert werden. Allerdings entstand unter verschiedenen Reaktionsbedingungen nur das Benzotriazolderivat von 3,4-Diamino-*N*-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid.



Formelbild 8

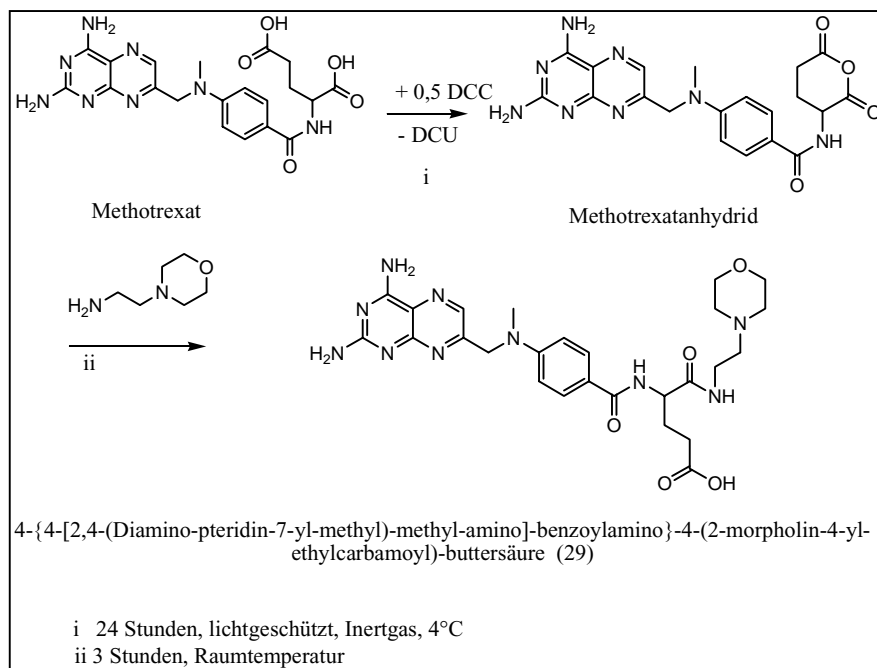
#### 4.1.4. Benzamid-Anthracyclin-Derivat

In einer einstufigen Synthese, bei der die Säureamidbindung mittels HATU geknüpft wurde, konnte das Anthrachinon-2-{*N*-[2-(diethylamino)ethyl]}carbonsäureamid **28** dargestellt werden.

Formelbild 9: Anthrachinon-2-{*N*-[2-(diethylamino)ethyl]}carbonsäureamid

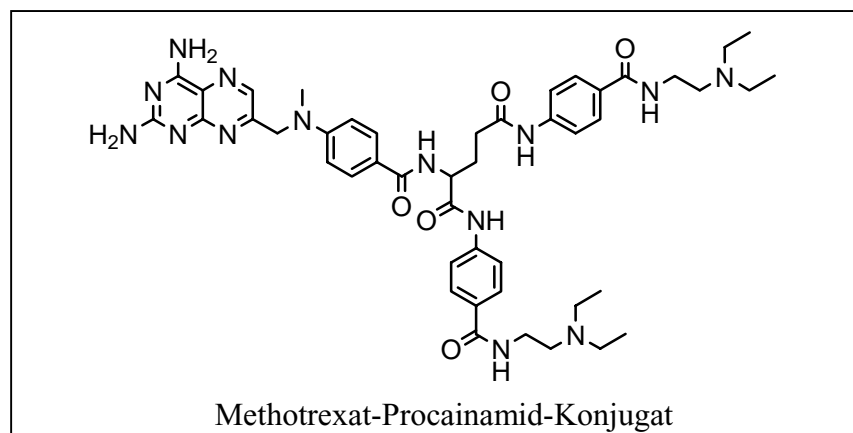
#### 4.1.5. Methotrexat-Benzamidkonjugate

Es wurden zwei Methotrexat-Benzamid-Konjugate synthetisiert. Die Umsetzung von Methotrexat mit 0,5 Äquivalenten DCC in wasserfreiem DMF unter Inertgas bei 4°C führte zur Bildung des nicht isolierten Methotrexatanhydrides [76], das nach Entfernung von DCU mit Morpholinoethylamin umgesetzt wurde. Die freie  $\gamma$ -Carboxylgruppe des Methotrexates war beabsichtigt, damit die Affinität zur Tetrahydrofolatreduktase erhalten bleibt und damit die zytostatische Wirksamkeit des Konjugates. Die Bildung des  $\alpha$ -Amides ist wahrscheinlicher, weil die Säureamidbindung einen stärkeren -I-Effekt auf diese Gruppe ausübt als auf die  $\gamma$ -ständige Carbonylgruppe des Säureanhydrides. [76]



Reaktionsschema 7: Synthese des Methotrexatkonjugates **29**.

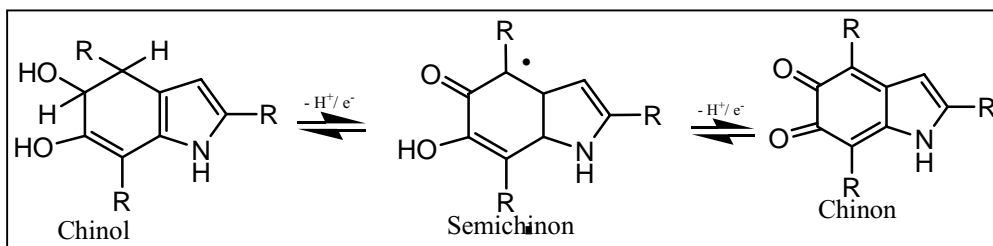
Die Abtrennung der Edukte und Nebenprodukte erfolgte säulenchromatografisch und danach mittels präparativer HPLC. Daneben wurde ein Methotrexat-Konjugat synthetisiert, bei dem beide Carboxylgruppen mit je einem Procainamidmolekül derivatisiert waren. Mit zwei Äquivalenten HATU als Kopplungsreagenz verlief die Konjugation problemlos.



Formelbild 10: (4-[2,4-(Diaminopyrido[3,2-d]pyrimidin-7-yl-methyl)-methyl]-amino)-benzoylamino)-pentandicarbonsäure-bis-{4-[2-(diethylamino)ethylcarbamoyl]phenyl}-amid (**30**)

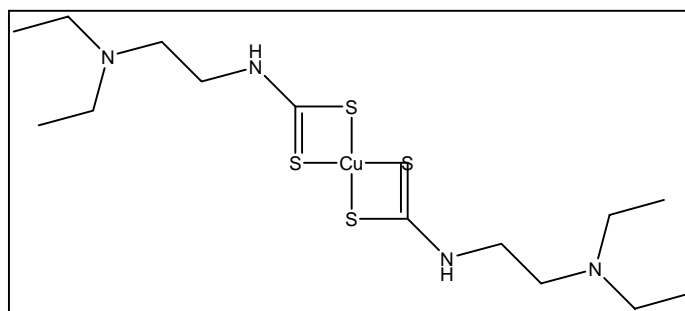
#### 4.1.6. Kupfer-Dithiocarbamat

Melanin enthält eine Reihe von freien Radikalen in Form von Semichinonen (s. Formelbild 11). Diese sind leicht oxidier- und reduzierbar. Ihre physiologische Funktion besteht darin, oxidativen und photochemischen Stress abzufangen. Die Komplexierung von Metallkationen durch Melanin könnte die Redoxreaktivität von Melanin drastisch verändern und oxidativen Stress verursachen. Die gezielte Einschleusung von Metallkationen in Melanome und der dadurch induzierte oxidative Stress könnte einen neuen therapeutischen Ansatz darstellen.[77]



Formelbild 11: Semichinone im Melanin [77]

Cu- und Zn-Dithiocarbamat-Komplexe, welche die Metallkationen in das Melanosom schleppen sollen, zeigen eine signifikante Melanomtoxizität, wobei Melanocyten weniger stark geschädigt werden als Melanome.[78] Um die Melanomspezifität dieser Dithiocarbamatmetallkomplexe noch zu erhöhen, wurde der Versuch unternommen, ein Benzamidstrukturelement mit einem Dithiocarbamat zu verknüpfen. Die Addition von Schwefelkohlenstoff an Procainamid war nicht möglich. Auch bei der Verwendung stärkerer Basen (Hydridanion und tert. Butylkalium) kam es nicht zur Bildung des gewünschten Adduktes. Schwefelkohlenstoff konnte mittels nukleophiler Addition an die primäre Aminofunktion von Diethylaminoethylamin angelagert werden. Die nachfolgende Komplexierung mit Kupfer(II)kationen gelang in verdünnter KOH.



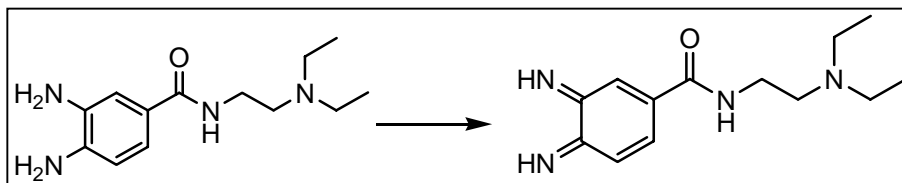
Formelbild 12: Kupfer-Dithiocarbamat (Verbindung **31**)

Basische Dithiocarbamate wurden bisher noch nicht hergestellt. Cu(II)-Kationen wurden gewählt, weil die von Farmer et. al. getesteten Kupferdithiocarbamate zytotoxischer waren als die entsprechenden Zinkkomplexe.

Die nachfolgende Ligandenaustauschreaktion, bei der zwei Chlorliganden von Kaliumtetrachloroplatinat(II) gegen einen 3,4-Diamino-*N*-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid-Liganden ausgetauscht werden sollten, verlief anders als erwartet. Zwar bildete sich auch das gewünschte Produkt, aber auch andere nicht abtrennbare Produkte.

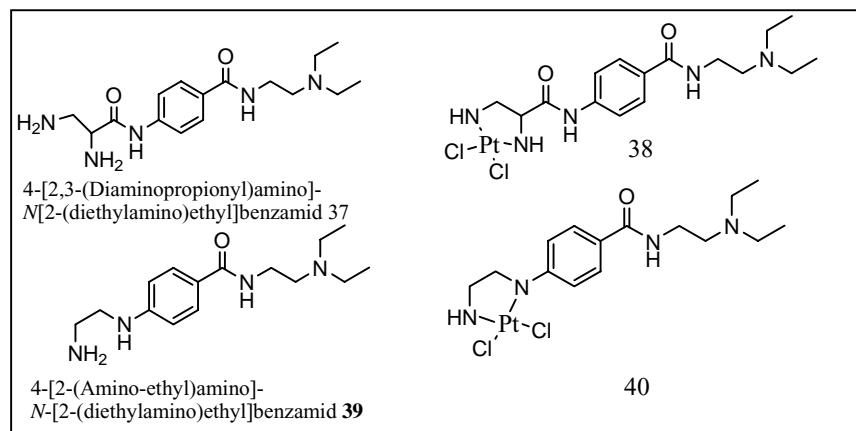


Ortho-Phenylendiamin wurde wegen seiner Eigenschaften als Reduktionsmittel als Feinkornentwickler in der Photographie verwendet. Besonders im basischen Milieu wird es zum Chinondiimin oxidiert. [80] Das Oxidationspotential des o-Phenylendiamins wird in entscheidendem Maße von den Substituenten im Ring beeinflusst. Elektronenziehende Gruppen erhöhen das Oxidationspotential. [81] Mit der para-ständigen Carbonylfunktion enthält auch 3,4-Diamino-N-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid eine elektronenziehende Gruppe. Im Komplex, der auch ein o-Phenylendiaminstrukturelement enthielt, selbst kam es höchstwahrscheinlich zu Redoxreaktionen, bei denen Ligand und Zentralatom ihre Oxidationszahl änderten. Jüstel et al. beschreiben ähnliche Effekte bei Ruthenium Komplexen, die einen ortho-Benzochinondiimin-Liganden enthalten. [82] In Abwesenheit von Tetrachloroplatinat (II) entstand unter den gleichen Reaktionsbedingungen das Oxidationsprodukt von 3,4-Diamino-N-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid.



Reaktionsschema 9: Oxidation von 3,4-Diamino-N-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid zum o-Chinondiimin.

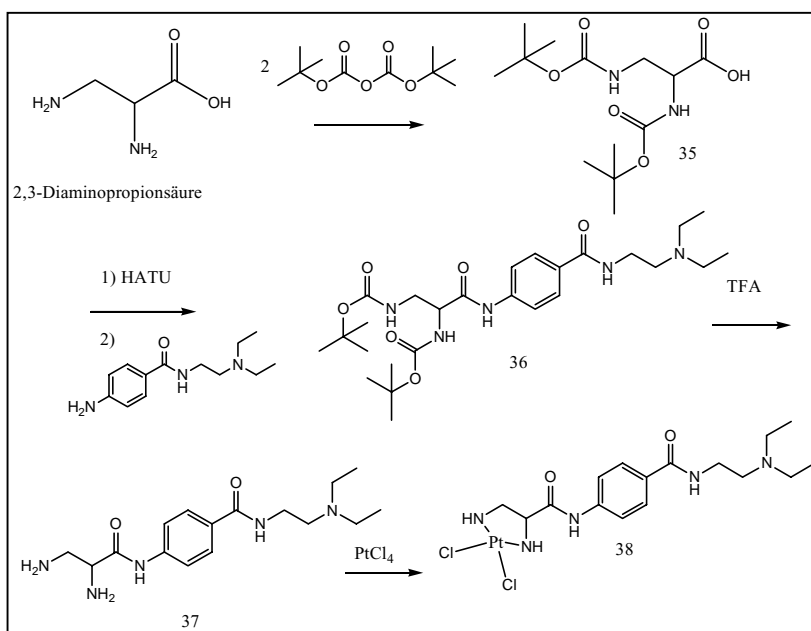
Die Isolierung eines reinen, einheitlichen Produktes schlug fehl, weil unter den Reaktionsbedingungen, die zur Bildung von cis-Platin und analogen Verbindungen notwendig sind, 3,4-Diamino-N-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid oxidiert wird. Damit war dieser Chelatligand unbrauchbar. Selbst nach der Isolierung kann es im Komplex selbst zu Redoxreaktionen kommen. Daher war es erforderlich Benzamidchelatligen zu synthetisieren, die diesen Nachteil nicht mehr aufweisen. Zwischen der elektronenziehenden Carbonylgruppe und dem für die Komplexbildung des Platins verantwortlichen Molekülteil muss ein Spacer eingebaut werden. Formelbild 14 zeigt die Benzamidliganden und die entsprechenden Komplexe, bei denen es nicht zu Redoxreaktionen kommt.



Formelbild 14: Neue Chelatliganden und die entsprechenden Komplexe

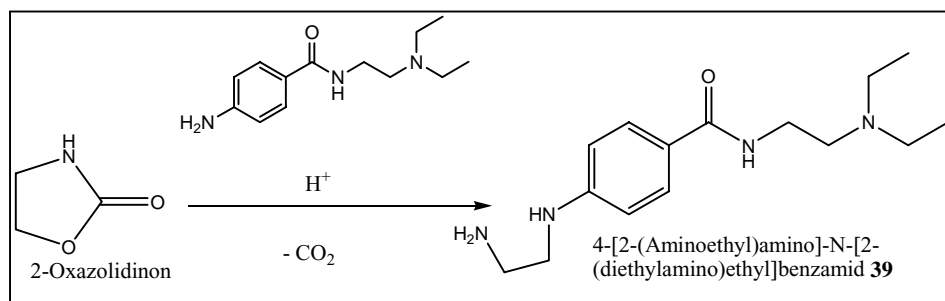
Die mehrstufige Synthese von 4-[2,3-(Diaminopropionyl)amino]-N-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid wird im folgenden Abschnitt abgehandelt. Vor der Konjugation von 2,3-Diaminopropionsäure an Procainamid wurden die beiden Aminofunktionen der

Diaminocarbonsäure mittels Boc-Anhydrid geschützt. 2,3-Bis-tert.-butoxycarbonylamino-propionsäure [83] wurde danach mit HATU an Procainamid konjugiert. Die nachfolgende Entschützung mit 25%iger Salzsäure führte zu dem gewünschten Chelatliganden.

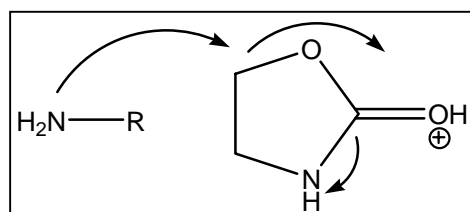


Reaktionsschema 10: Synthese von 4-[2,3-(Diaminopropionyl)amino]-N-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid

4-[2-(Aminoethyl)amino]-N-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid **39** wurde durch die Umsetzung von Procainamidhydrochlorid mit 2-Oxazolidinon bei 170°C in Anwesenheit von konzentrierter Salzsäure erhalten.



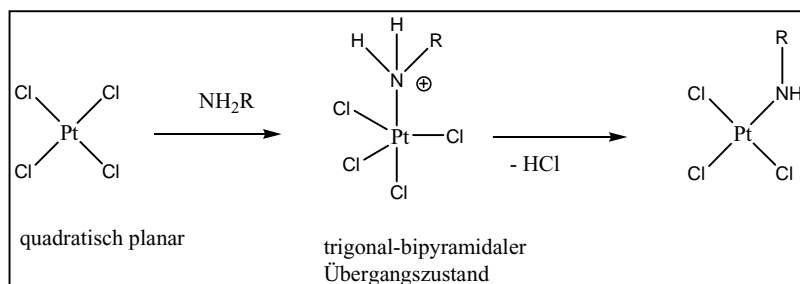
Reaktionsschema 11: Synthese von 4-[2-(Aminoethyl)amino]-N-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid



Reaktionsschema 12: Mechanismus der sauren Decarboxylierung von 2-Oxazolidinon

Durch die Protonierung des Carbonylsauerstoffs des cyclischen Carbamidsäureesters 2-Oxazolidinon wird das 5'-C-Atom positiv polarisiert. Das primäre Amin greift nukleophil an diesem C-Atom an. Es kommt nachfolgend zur Decarboxylierung. [84]

Die eigentlichen Platinkomplexe wurden durch Ligandenaustauschreaktionen erhalten. Platin(II) hat in Komplexen die Koordinationszahl 4 und bildet quadratisch-planare Komplexe. Ligandenaustauschreaktionen folgen bei quadratisch-planaren Komplexen einem bimolekularen Verdrängungsmechanismus. Dabei tritt intermediär ein trigonal-bipyramidaler Übergangszustand auf. Nach Elimination des austretenden Liganden entsteht wieder ein quadratisch-planarer Komplex.



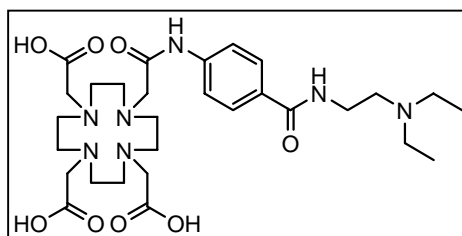
Reaktionsschema 13: Reaktionsmechanismus der Ligandenaustauschreaktion

Den Effekt, den ein koordinierter Ligand auf die Substitutionsgeschwindigkeit eines anderen Liganden ausübt, bezeichnet man als trans-Effekt. Ein negativ geladener Ligand wirkt labilisierend auf einen zu ihm trans-ständigen Liganden, jedoch nicht auf einen zu ihm cis-ständigen Liganden. [85] Durch 24stündiges Rühren bei Raumtemperatur äquimolarer Mengen des Chelatliganden und von Kaliumtetrachloroplatinat(II) bei pH = 6 wurden die Platinkomplexe erhalten, die aus dem Reaktionsgemisch präzipitierten.

#### 4.1.8. Synthese der Gadoliniumkomplexe

##### 4.1.8.1. DOTA-Procaïnamid

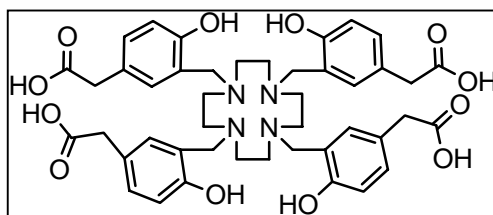
DOTA-tris(t-butyl ester) (= 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7-tris(essigsäure-t-butylester)-10-essigsäure) wurde mittels HATU an Procainamid konjugiert. Die Abspaltung aller tert. Butylester-Schutzgruppen gelang mit einem TFA-Wasser-Triisopropylsilan-Gemisch [86] innerhalb von 24 Stunden bei Raumtemperatur. Der Chelatligand DOTA-Procaïnamid (= [1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7-tris(essigsäure-t-butylester)-10-acetamid]-N-[2-(diethylaminoethyl)]-benzamid) konnte mit Diethylether aus dem Reaktionsgemisch ausgefällt werden und nachfolgend aus Methanol-Ethylacetat-Chloroform kristallisiert werden. 24stündiges Refluxieren einer wäßrigen Lösung von DOTA-Procaïnamid und Gadolinium(III)acetat lieferte den gewünschten Komplex **42**.



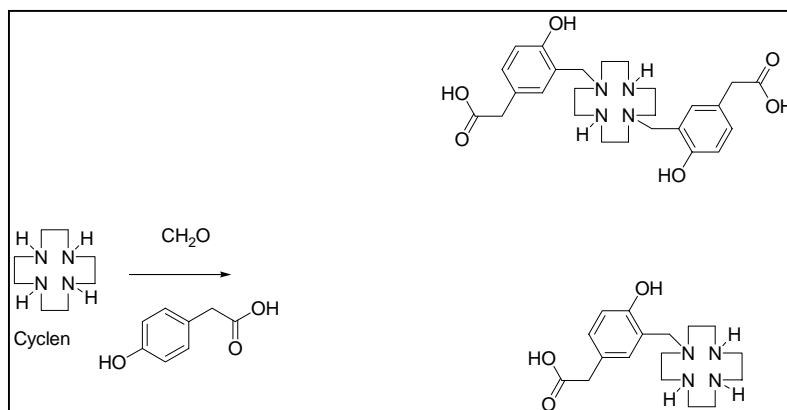
Formelbild 15: Strukturformel von Gadoliniumkomplex von [1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7-tris(essigsäure)-10-acetamid]-N-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid **41**

#### 4.1.8.2. Versuche zur Synthese von {4-Hydroxy-3-[4,7,10-tris-(5-carboxymethyl-2-hydroxy-benzyl)-1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl-methyl]-phenyl}-essigsäure

Das Vorhandensein von drei sauren Carboxylgruppen könnte sich negativ auf eine mögliche Anreicherung im Melanom auswirken. Die Gründe dafür werden im Abschnitt über den Anreicherungsmechanismus der Benzamide im Melanosom genannt. Daher wäre es wünschenswert ein DOTA-Derivat zu synthetisieren, bei dem statt der Carboxylgruppen phenolische Hydroxylgruppen vorhanden sind. {4-Hydroxy-3-[4,7,10-tris-(5-carboxymethyl-2-hydroxy-benzyl)-1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl-methyl]-phenyl}-essigsäure hätte diese Eigenschaften und könnte außerdem mit vier Diethylaminoethylaminmolekülen derivatisiert werden. Dies hätte gegenüber DOTA zwei Vorteile. Zum einen wäre das für die Melanomanreicherung verantwortliche Strukturelement viermal im Molekül vorhanden, zum anderen wären statt der Carboxylgruppen die weniger sauren phenolischen OH-Gruppen an der Komplexbildung beteiligt. Dies würde insgesamt zu einem Überwiegen der basischen Funktionen im Molekül führen, was sich positiv auf die Anreicherung im Melanom auswirken sollte. Der Hauptnachteil bestünde in der relativ großen Molmasse.



Formelbild 16: Strukturformel von {4-Hydroxy-3-[4,7,10-tris-(5-carboxymethyl-2-hydroxy-benzyl)-1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl-methyl]-phenyl}-essigsäure



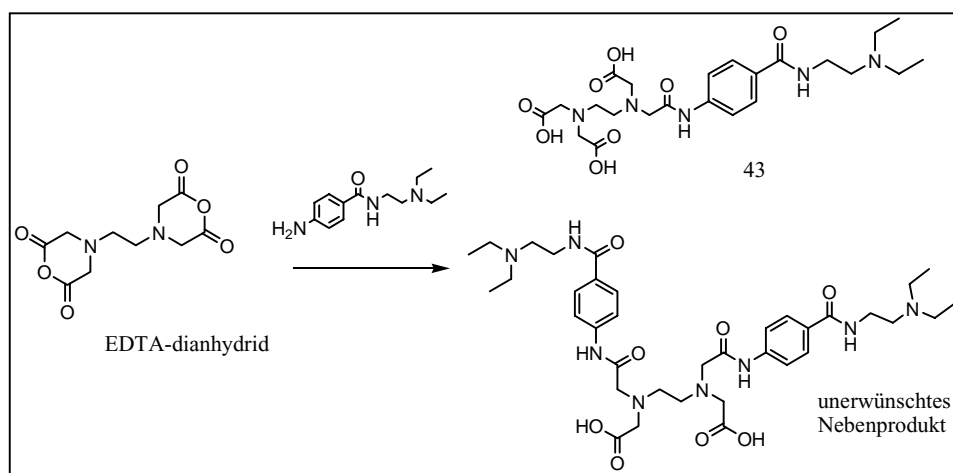
Reaktionsschema 14: Versuch der Synthese von {4-Hydroxy-3-[4,7,10-tris-(5-carboxymethyl-2-hydroxy-benzyl)-1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl-methyl]-phenyl}-essigsäure

Das strukturell ähnliche HBED-CC lässt sich mittels einer Mannich Reaktion herstellen.[87] {4-Hydroxy-3-[4,7,10-tris-(5-carboxymethyl-2-hydroxy-benzyl)-1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl-methyl]-phenyl}-essigsäure sollte analog aus Cyclen, Formaldehyd und p-Hydroxyphenylacetic acid synthetisiert werden. Allerdings entstand immer nur ein Gemisch aus {3-[7-(5-Carboxymethyl-2-hydroxy-benzyl)-1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl-methyl]-4-

hydroxy-phenyl}-essigsäure und [4-Hydroxy-3-(1,4,7,10tetraaza-cyclododec-1-yl-methyl)-phenyl]-essigsäure. Die Variation der Formaldehydmenge, des pH-Wertes und der Reaktionszeit führte nicht zur Bildung des gewünschten Produktes.

#### 4.1.8.3. EDTA-Procaïnamid 43

Die Suche nach einem Gadoliniumkomplex mit einem relativ niedrigen Molekulargewicht, führte zu dem Versuch, EDTA mit Procainamid zu verknüpfen. Der Nachteil könnte die mangelnde Stabilität des Komplexes für eine in vivo Anwendung sein, da nicht komplexiertes Gadolinium toxisch ist. Die Reaktion von einem Äquivalent Ethylen-1,2-diamin-1,1,2,2-tetraessigsäuredianhydrid mit einem Äquivalent Procainamid lieferte hauptsächlich das Bis-Procainamid-EDTA-Konjugat statt des gewünschten Monokonjugates (Ethylen-1,2-diamin-1,2,2-triessigsäureacetamido)-N-(2-diethyl-aminoethyl)-benzamid [=EDTA-Procainamid]. (s. Reaktionsschema 15). Die Aufreinigung mittels präparativer HPLC war insofern problematisch, weil die Peaks der beiden Produkte zu nahe beieinander lagen und außerdem die Ausbeute des gewünschten Produktes zu niedrig war.



Reaktionsschema 15: Synthese von EDTA-Procainamid

Die Lösung dieses Problems bestand in der Schützung von drei der vier Carboxylfunktionen, um dann gezielt die Umsetzung der noch freien Carboxylgruppe mit Procainamid durchzuführen zu können. Zunächst wurde der EDTA-Tetramethylester **44** synthetisiert, der durch dreistündiges Refluxieren einer Suspension von EDTA in Methanol in Anwesenheit von konzentrierter Schwefelsäure erhalten werden konnte. Die Synthese des EDTA-Trimethylesters **45** [88] erfolgte durch die Hydrolyse des EDTA-Tetramethylesters. Der EDTA-Tetramethylester bildet mit Cu(II)-Kationen einen Chelatkomplex, der bei pH=4-5 selektiv zum EDTA-Trimethylester hydrolysiert wird. Die Kupferkationen wurden nachfolgend mit Schwefelwasserstoff als Kupfersulfid gefällt. [88]

Die Kondensation des EDTA-trimethylesters mit Procainamid und die nachfolgende basisch katalysierte Esterhydrolyse führten zu Bildung von EDTA-Procainamid.

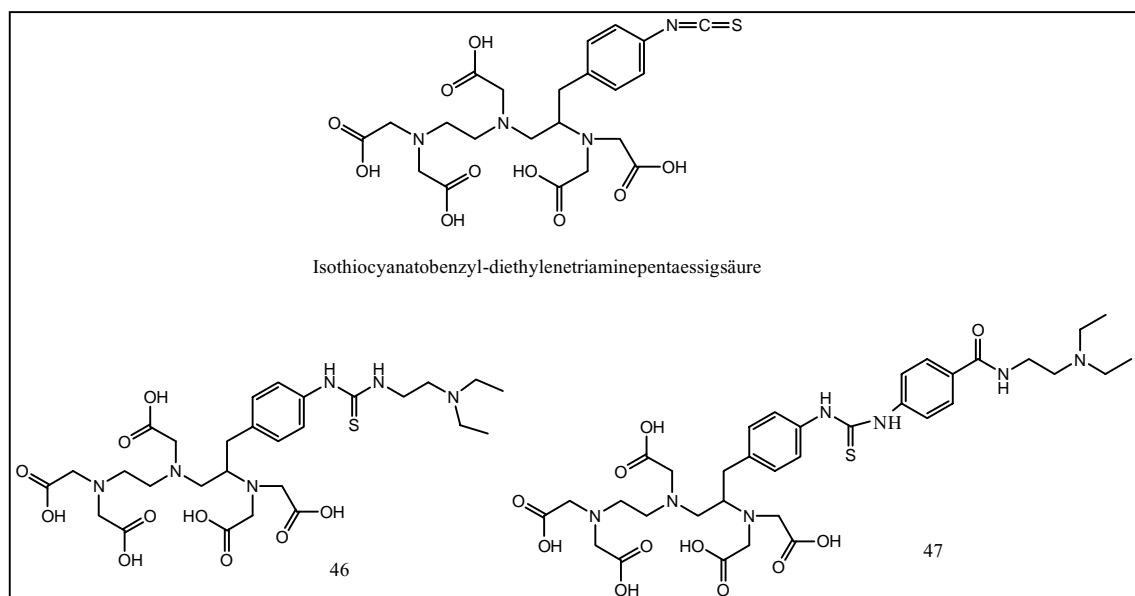
Eine Komplexbildung des Chelatliganden wurde nicht vorgenommen, da er nur über sechs Koordinationsstellen verfügt. Stabile Gadoliniumkomplexe werden jedoch nur mit Chelatliganden erhalten, die über acht Ligatoren verfügen. DTPA ist ein EDTA-Homologes, das über acht Koordinationsstellen verfügt.

#### 4.8.1.4. DTPA-Benzamide

Dabei gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten, Benzamide mit DTPA zu koppeln.

##### 4.1.8.4.1. Addition von Benzamiden an p-Isothiocyanatobenzyl-diethylenetriamin-pentaessigsäure

Procainamid und Diethylaminoethylamin ließen sich in DMF bei 4°C an p-Isothiocyanatobenzyl-diethylenetriamin-pentaessigsäure addieren. Formelbild 17 zeigt die Strukturformeln dieser Chelatliganden.



Formelbild 17

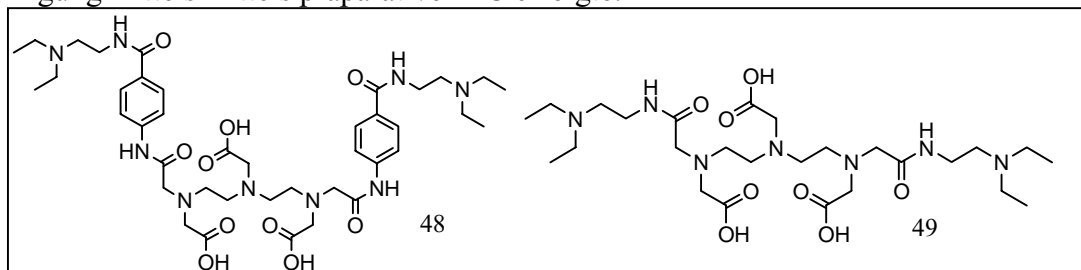
links unten: {(2-(Bis-carboxymethyl-amino)-3-{4-[3-(2-diethylamino-ethyl)-thioureido]-phenyl}-propyl)-[2-(bis-carboxymethyl-amino)-ethyl]-amino}-essigsäure **46**

rechts unten: {[2-(Bis-carboxymethyl-amino)-3-(4-{3-[4-(2-diethylamino-ethylcarbamoyl)-phenyl]-thioureido}-phenyl)-propyl]-[2-(bis-carboxymethyl-amino)-ethyl]-amino}-essigsäure **47**

Die Produkte konnten mit Diethylether aus dem Reaktionsgemisch ausgefällt werden. Das in verdünnter NaOH gelöste Präzipitat wurde mehrmals mit Dichlormethan gewaschen, um nicht umgesetztes Procainamid bzw. Diethylaminoethylamin zu entfernen. Mittels präparativer HPLC wäre eine weitere Aufreinigung möglich. Weil die entsprechendem Gadoliniumkomplexe mehr saure als basische Gruppen aufweisen, wäre eine Anreicherung der Verbindungen im Melanosom nicht zu erwarten gewesen.

#### 4.1.8.4.2. DTPA-Benzamid-Konjugate

Daher schien die weitere Möglichkeit, DTPA-Benzamid-Konjugate zu erhalten, sinnvoller. Durch die Reaktion von einem Äquivalent DTPA-dianhydrid mit 2 Äquivalenten Procainamid oder Diethylaminoethylamin konnten die sehr hydrophilen Liganden erhalten werden, deren Aufreinigung mittels präparativer DC erfolgte.



Formelbild 18

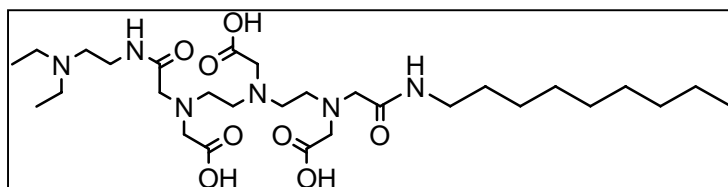
Links: {Bis-[2-(carboxymethyl-{{4-(2-diethylamino-ethylcarbamoyl)-phenylcarbamoyl}-methyl}-amino)-ethyl]-amino}-essigsäure **48**

Rechts: [Bis-(2-{carboxymethyl-[(2-diethylamino-ethylcarbamoyl)-methyl]-amino}-ethyl)-amino]-essigsäure **49**

Die Komplexierung erfolgte durch 24 stündiges Refluxieren der wäßrigen Lösung des Chelatliganden und von Gadolinium(III)acetat. Da die Komplexe in Wasser unlöslich sind, kam es mit zunehmender Reaktionszeit zur Bildung eines Präzipitates, bestehend aus den gewünschten Produkten. Diese waren in DMSO nur mäßig löslich, in anderen gängigen Lösungsmitteln überhaupt nicht.

#### 4.1.8.4.3. DTPA-Diethylaminoethylamin-Nonylamin-Konjugat

Da die Internalisierung der Komplexe in B16 Melanomzellen sehr gering war, sollte überprüft werden, ob lipophilere Komplexe günstiger wären. Durch die Reaktion von einem Äquivalent DTPA-dianhydrid mit einem Äquivalent Diethylamin und einem Äquivalent Nonylamin sollte ein lipophilerer Chelatligand erhalten werden. Die Komplexierung gelang durch mehrstündiges Erhitzen einer wäßrigen Lösung des Liganden in Anwesenheit von Gadolinium(III)acetat.

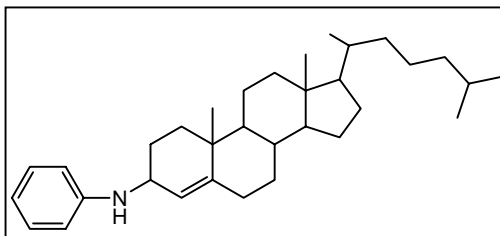


Formelbild 19: {(2-{Carboxymethyl-[2-diethylamino-ethylcarbamoyl]-methyl}-amino)ethyl)-[2-(carboxymethylnonylcarbamoyl-methyl-amino)-ethyl]amino}-Essigsäure **52**

Durch die Konjugation mit einem Cholesterinderivat sollte ein weiterer lipophilerer Komplex erhalten werden. 5-Cholesten-3 $\beta$ -[N-phenyl]amin reagierte auch bei höheren Temperaturen und in der Anwesenheit des Acylierungskatalysators DMAP nicht mit DTPA-dianhydrid. Auch die Konjugation an DOTA schlug fehl. Das sekundäre Amin des Cholesterinderivates könnte möglicherweise sterisch behindert sein.



Formelbild 20: 5-Cholesten-3 $\beta$ -[N-phenyl]amin



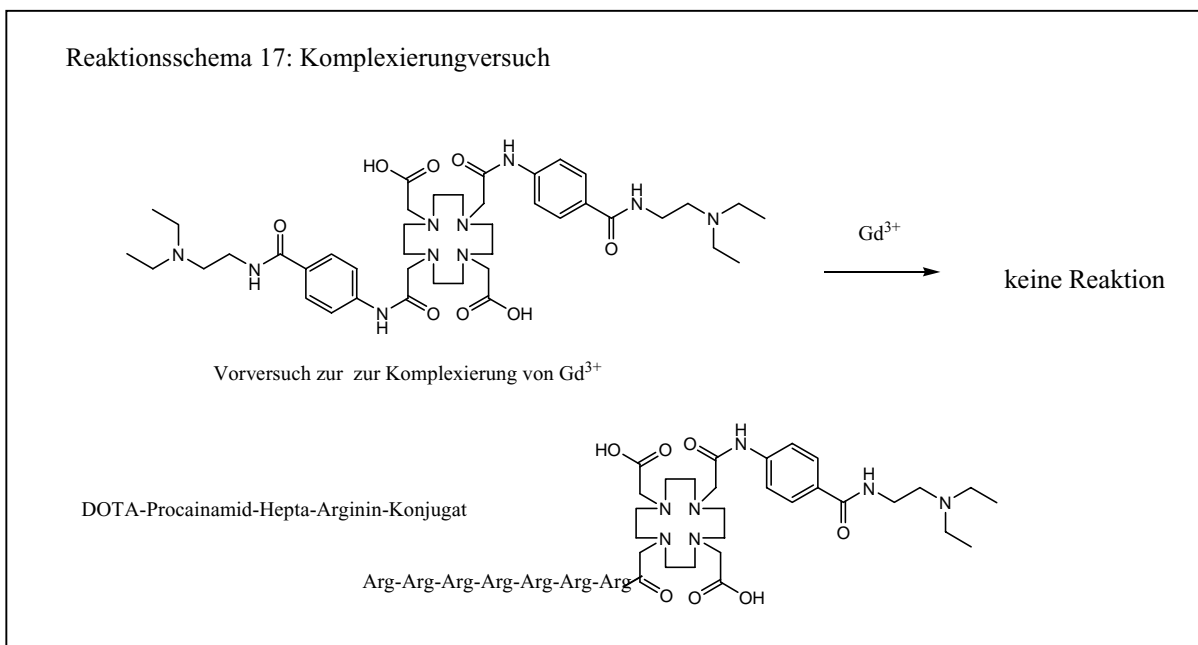
Der getestete, lipophilere Komplex wurde sogar noch schlechter von den Zellen aufgenommen. Aus diesem Grund schien die weitere Synthese lipophilerer Choleatkomplexe nicht sinnvoll.

#### 4.1.8.5. Konjugation der Benzamid-DOTA- und Benzamid-DTPA-Komplexe mit Schleppermolekülen zur Verbesserung der Aufnahme in die Zelle

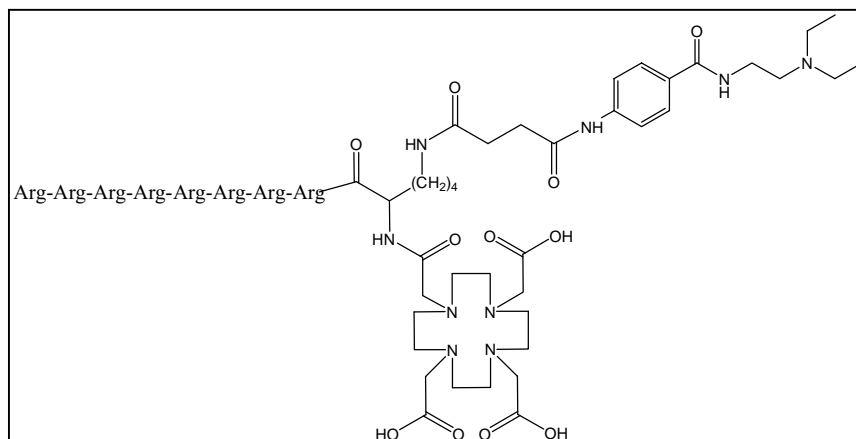
Dahingegen erschien es sinnvoll, die Benzamidchelatoren an Polyarginin, Folsäure und Polyamine zu konjugieren. [89], [90], [91], [92], [93] Diese werden durch spezielle Transportmechanismen in die Zelle transportiert. Die Benzamidchelatoren sollten durch diese Schlepper in die Zelle geschleust werden.

##### 4.1.8.5.1. Polyarginin als Schlepper

Die einfachste Lösung wäre die Konjugation von DOTA-Procainamid an Polyarginin. Es wurde ein Vorversuch vorgenommen, bei dem geprüft werden sollte, ob zwei freie Carboxylgruppen für die Komplexierung von Gadolinium ausreichend sind. Dazu wurde 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,7-bis(essigsäure-tert.-butylester)-4,10-essigsäure mit zwei Äquivalenten Procainamid verknüpft und nach der Abspaltung der tert. Butylester-Schutzgruppen Komplexierungsversuche unternommen. DOTA-bis-Procainamid konnte  $Gd^{3+}$  nicht komplexieren. Es sind wohl drei Carboxylgruppen für die Komplexierung von Gadolinium notwendig. Das Polyarginin-DOTA-Procainamid-Konjugat wäre demzufolge auch nicht in der Lage,  $Gd(III)$  zu komplexieren.



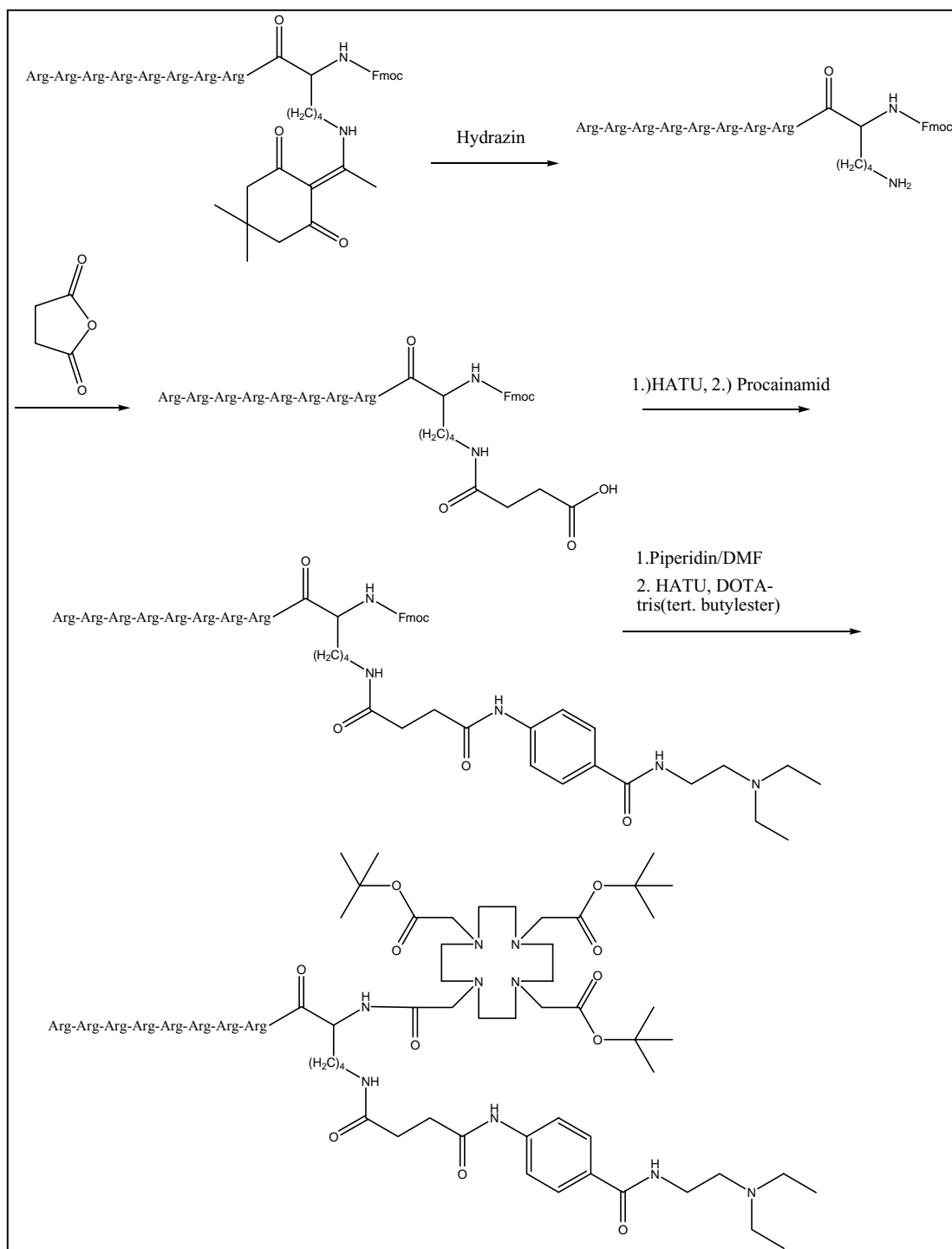
Daher wurde ein anderes Molekül konzipiert, bei dem drei freie Carboxylgruppen vorhanden sind. Das gesamte Molekül sollte mittels Festphasensynthese dargestellt werden. Die Strukturformel dieses Chelatliganden zeigt das unten stehende Formelbild.



Formelbild 21: Neuer Chelatligand mit Polyargininstrukturelement **54**

Das Peptid wurde vom C-Terminus her mittels der Fmoc-Strategie synthetisiert. Zunächst wurde ein Octo-arginin synthetisiert. Die Elongation des Oligopeptides erfolgte durch Ankonjugation von Fmoc-Lys-(Dde)-OH. Durch die Zugabe von Hydrazin konnte die Dde-Schutzgruppe selektiv abstrahiert werden. Die nun entschützte freie Seitenkettenaminofunktion des Lysins wurde mit Bernsteinsäureanhydrid zur Reaktion gebracht. Auf diese Weise wurde eine Carboxylgruppe in das Oligopeptid eingeführt, die mit Procainamid kondensiert werden konnte. Eine Probeabspaltung sollte zeigen, ob die Reaktion funktioniert hat und Aussagen über die Ausbeute geben. Schließlich wurde nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Lysin, noch

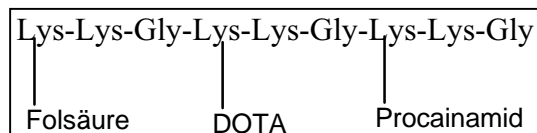
Dota-tris-(tert. butyl ester) ankonjugiert. Die Abspaltung des Oligopeptides vom Harz lieferte den Chelatliganden, der mittels präparativer HPLC aufgereinigt wurde.



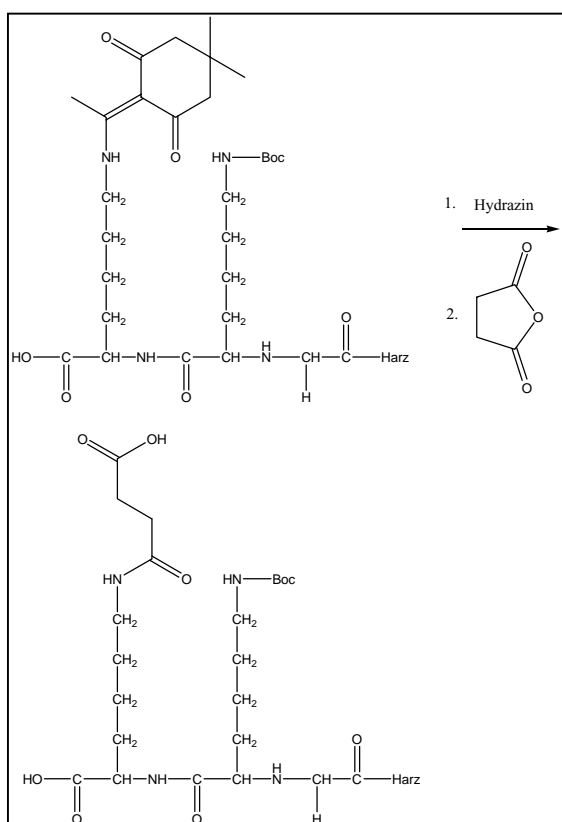
Reaktionsschema 18: Synthese des Chelatliganden mit Octaargininstrukturelement

#### 4.1.8.5.2. Folsäure als Schlepper

Die Synthese des Chelators, der Folsäure als Schlepper enthält, erfolgte komplett an der Festphase. Im Folgenden werden die einzelnen Reaktionsschritte dargestellt, die zu dem gewünschten Molekül führten.



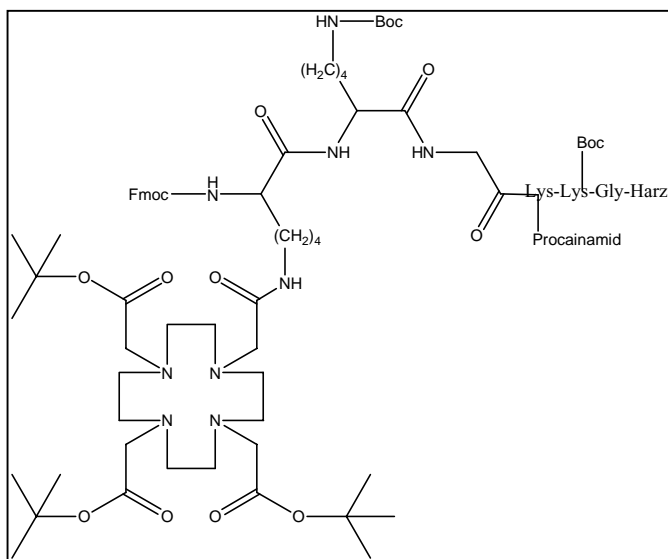
Formelbild 22: Folsäurekonjugat (Verbindung 55)



Reaktionsschema 19: Teilschritt 1 bestand in der Konjugation von Procainamid an das Tripeptid

Die Synthese des derivatisierten Peptides erfolgte vom C-Terminus in Richtung des N-Terminus. Zunächst wurde ein Tripeptid synthetisiert, wobei zuerst Glycin an das Harz ankonjugiert wurde, gefolgt von einem Lysin, dessen Seitenkettenaminofunktion Boc geschützt war. Die Kette wurde dann mit einem Fmoc-(Dde)-Lys verlängert. Nach Abspaltung der Dde-Schutzgruppe, wurde die nun freie Aminofunktion mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt. Auf diese Weise erfolgte die Einführung einer Carboxylgruppe in das Peptid, die mit Procainamid kondensiert wurde (Reaktionsschema 20). Im nächsten Reaktionsschritt wurde das Tripeptid zunächst mit Glycin und dann mit Fmoc-(Boc)-Lys zum Pentapeptid verlängert. Durch die Kopplung des Pentapeptides mit Fmoc-(Dde)-Lys und nachfolgender Entschützung der Seitenkettenaminofunktion konnte das Hexapeptid mit DOTA-tris(tert.butyl ester) konjugiert werden (siehe Formelbild 22). Die weitere Elongation der Hauptkette mit Gly, Fmoc-(Boc)-Lys und Fmoc-(Dde)-Lys lieferte ein Nonapeptid, dessen Seitenkettenaminofunktion mit Folsäure derivatisiert wurde. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Folsäure in DMSO und anderen polaren organischen Lösungsmitteln, wurde der letzte Kopplungsschritt im wässrigen Milieu mit dem wasserlöslichen

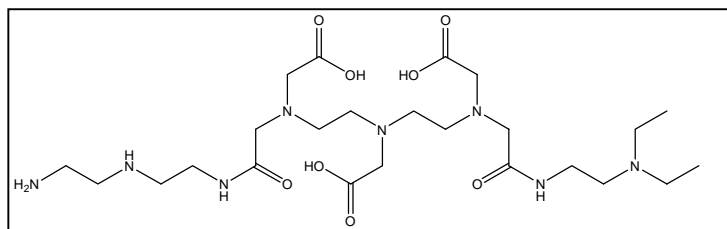
Kopplungsreagenz EDC realisiert. Die Abspaltung vom Harz lieferte das gewünschte Peptid in sehr geringer Ausbeute.



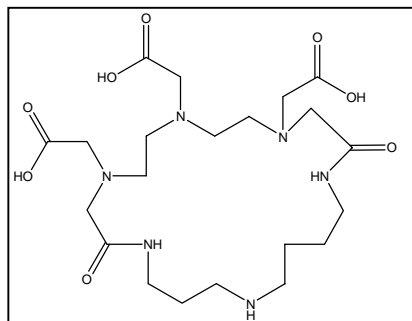
Formelbild 23: Kettenverlängerung und Konjugation mit DOTA-tris(tert.butyl ester)

#### 4.1.8.5.3. Polyamine als Schlepper

An der Internalisierung von Polyaminen sind sowohl aktive als auch passive Transportprozesse beteiligt.[94] Spermin reichert sich im Melanosom an.[52] Daher schienen Polyamine noch geeigneter zu sein, um melanomselektive MRT-Kontrastmittel zu erhalten. Die Umsetzung von 1 Äquivalent DTPA-dianhydrid mit 1 Äquivalent Diethylaminoethylamin und 1 Äquivalent des nicht physiologisch vorkommenden Polyamins Bis-(2-aminoethyl)-amin wurde das in Formelbild 24 dargestellte Konjugat erhalten.

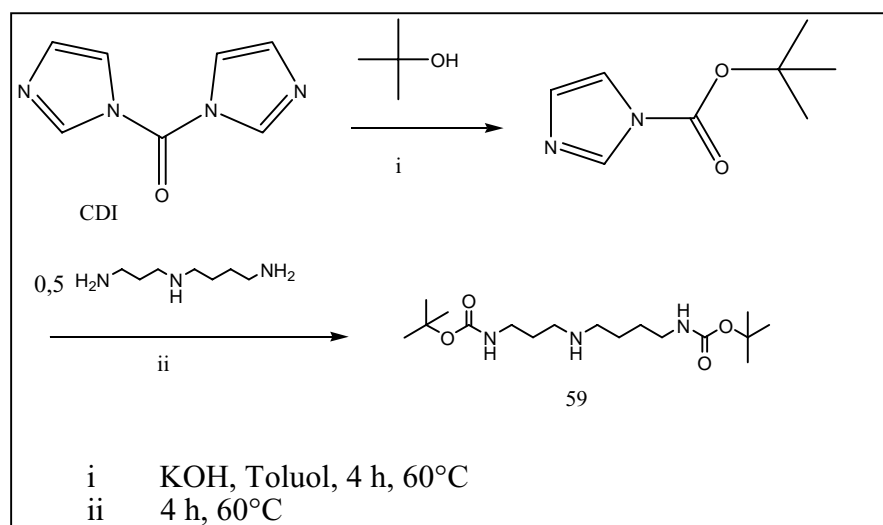
Formelbild 24: Diethylaminoethylamin-Spermin-DTPA-Konjugat **56**

Die Reaktion von einem Äquivalent DTPA-dianhydrid mit 2 Äquivalenten Spermidin führt zu einem cyclischen Produkt (Formelbild 25), das jedoch nur noch eine basische Gruppe enthält.



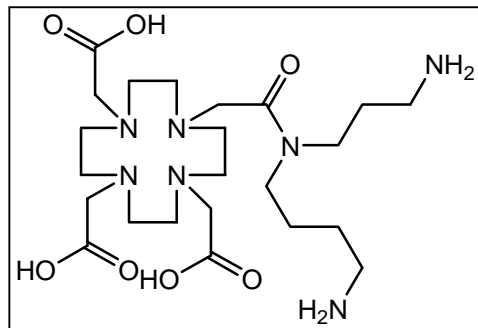
Formelbild 25: 4,10-Bis-(carboxymethyl)-2,12-dioxo-1,4,7,10,13,17-(hexaaza-cyclohepticos-7-yl)-essigsäure **58**

Es war notwendig die primären Aminogruppen des Polyamins zu schützen, um das Polyamin selektiv mit der sekundären Aminofunktion an den Chelatliganden zu konjugieren. Die selektive Schützung der primären Aminofunktionen des Spermidins gelang durch die Umsetzung von Carbonyldiimidazol (CDI) mit einem Äquivalent tert. Butanol. Das intermediär gebildete tert. Butoxycarbonylimidazol reagierte mit 0,5 Äquivalenten Spermidin 1,10-Di-Boc-Spermidin. Die Methode der selektiven Schützung von primären Aminofunktionen neben sekundären wurde erstmals von Rannard et al. beschrieben. [95], [96]



Reaktionsschema 20: Selektive Schützung primärer Aminofunktionen

Der Chelatligand DOTA konnte nachfolgend durch Konjugation des geschützten Spermidins an DOTA-tris-tert-butylester mittels DCC und nachfolgender Abspaltung der Schutzgruppen mit einem TFA/Wasser/Triisopropylsilan-Gemisch erhalten werden. Der Komplex löste sich nicht in Wasser und auch nicht in DMSO.

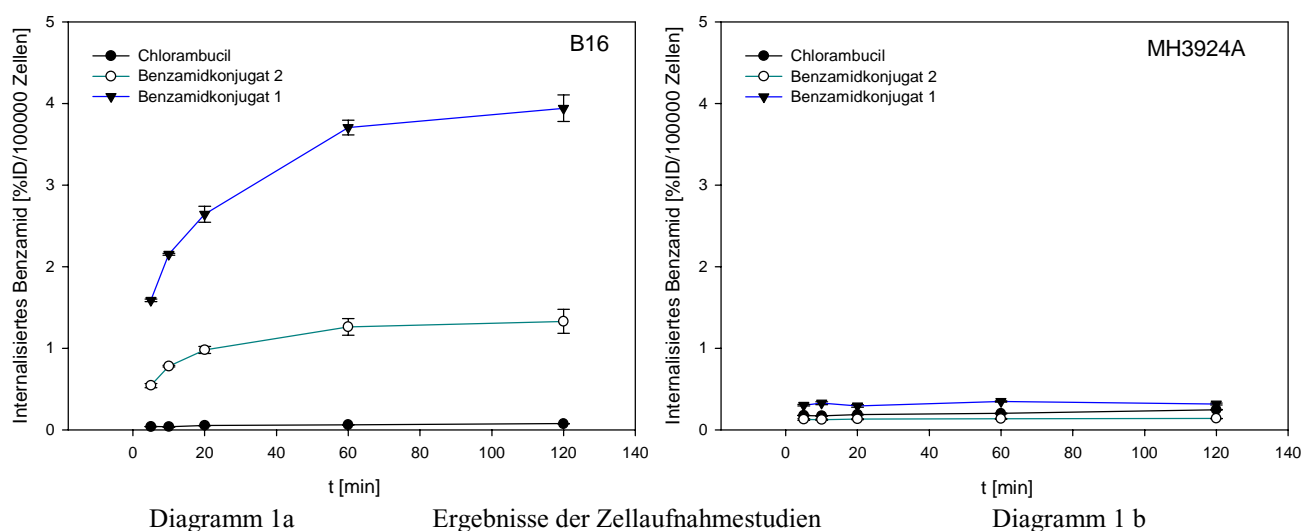


Formelbild 26: 4-([4-(Aminobutyl)]-[3-aminopropyl]carbamoyl-methyl}-7,10-bis-[carboxymethyl-(1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl)]-essigsäure **60**

## 4.2. Biologische Experimente

### 4.2.1. Anreicherungskinetik und Organverteilung von Benzamidkonjugaten in B16 Melanomzellen

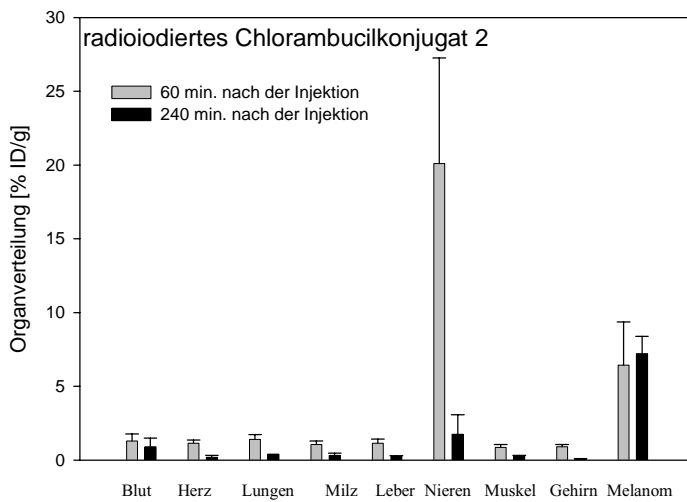
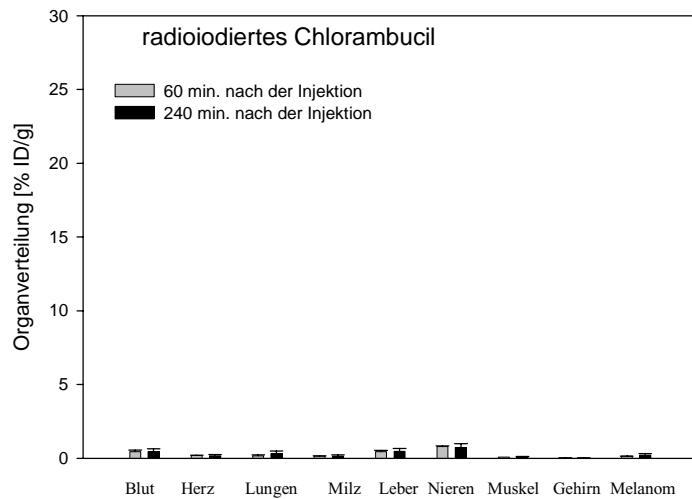
Die in vitro Anreicherungskinetik von Benzamidkonjugaten wurde untersucht und mit der des unveränderten Zytostatikums Chlorambucil verglichen. Dazu wurde die intrazelluläre Menge zweier radioaktiv markierter Benzamidkonjugate und des mit Iod-131 markierten Chlorambucils in B16 Melanomzellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inkubation der Zellen mit den Verbindungen bestimmt. Als Vergleichszelllinie diente das Morris Hepatom MH3924A. Im Vergleich zu radioiodiertem Chlorambucil reicherten sich die Benzamidkonjugate **1** und **2** in den B16 Melanomzellen an. Das Konjugat **1** akkumulierte stärker in B16 Melanomzellen als das Konjugat **2**. Keine der Verbindungen reicherte sich in MH3924A an.



Daraufhin wurde die Organverteilung der Verbindungen in vivo bestimmt. Dazu diente das Mausmelanommodell. Mäusen, denen B16 Melanomzellen transplantiert wurden, erhielten zwei Wochen später entweder radioiodiertes Chlorambucil oder eines der beiden Chlorambucil-Benzamidkonjugate appliziert. Die Organverteilung der Verbindungen wurde 1 Stunde und 6 Stunden nach der Gabe der Verbindungen bestimmt. Während sich das  $^{131}\text{I}$ -Chlorambucil nicht im Tumor anreicherte, kam es zur Anreicherung der Benzamidkonjugate im Melanom. Das Chlorambucil-Procaïnamid-Konjugat **1** reicherte sich besser im Tumor an als das Chlorambucil-Diethylaminoethylamin-Konjugat **2**. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten der in vitro Anreicherungsversuche. Die Diagramme 2a, b, c zeigen die Ergebnisse der Organverteilungsuntersuchungen im Einzelnen.



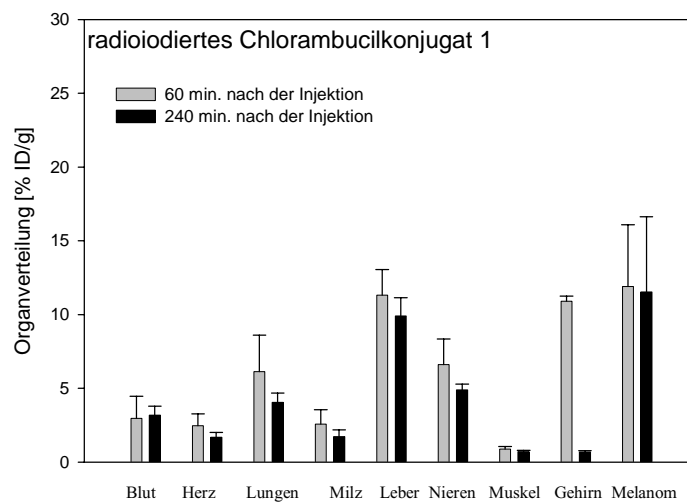
Diagramm 2a



**Diagramme 2a, b, c:** Organverteilung von  $^{131}\text{I}$ -Iodo-Chlorambucil und der radioiodierten Benzamidkonjugate 1 und 2 sowie im C57Bl/6 – B16 Melanommausmodell 1 Stunde (graue Balken) und 6 Stunden (schwarze Balken) nach der Injektion. Für jeden Zeitpunkt und jede Verbindung wurden 3 Mäuse verwendet.

Diagramm 2b

Diagramm 2 c



Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse der beiden vorhergehenden Versuche wurde eine Reihe von Benzamid-Zytostatika-Konjugaten synthetisiert, und deren Zytotoxizität für B16 Melanomzellen bestimmt. Als Vergleichszelllinien dienten Morris Hepatom Zellen MH3924A (Rattenhepatom) und HeLa Zellen (humanes Zervixkarzinom). Es sollte untersucht werden, ob die Konjugate den ursprünglichen Zytostatika Chlorambucil und Dacarbazin in ihrer Wirkung überlegen sind, und ob die Wirkung auf andere Zelllinien weniger stark ausgeprägt ist, als auf B16 Melanomzellen. Darüberhinaus wurde die Wirkung der am besten wirksamen Verbindungen - bezogen auf B16 Melanomzellen - an SkMel 28 (humanen Melanomzellen) und an 3T3 NIH (Mausfibroblasten) getestet. Schwankungen des Melaningehaltes der B16 Melanomzellen führten dazu, dass die  $IC_{50}$ -Werte ebenfalls variierten. Bei gering melanisierten Zellen war die Wirkung der Zytostatika stärker. Insbesondere frisch aufgetaute Zellen hatten einen geringeren Melaningehalt. Daher war es notwendig stetig neue Zellen aufzutauen und dann über eine bestimmte Zeit zu passagieren. Auf diese Weise wurde ein annähernd gleicher Melaningehalt der B16 Melanomzellen sichergestellt. Um die  $IC_{50}$ -Werte der verschiedenen Zytostatika miteinander vergleichen zu können, war die Testung an B16 Melanomzellen mit gleichem Melaningehalt erforderlich.

## 4.2.2. Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessungen

### 4.2.2.1. Chlorambucil-Konjugate

Alle Chlorambucilkonjugate waren wirksamer als Chlorambucil selbst. Nicht nur die B16 Melanomzellen zeigten eine größere Sensitivität gegenüber den Verbindungen, sondern auch die anderen Zelllinien. MH3924A Zellen wurden von dieser Verbindungsklasse am stärksten in ihrer Proliferation gehemmt; die  $IC_{50}$  lag zwischen 10 und 42  $\mu M$  für alle 5 Chlorambucilkonjugate. Verbindung **1** zeigte die beste Melanomtoxizität, gefolgt von Verbindung **4** und Verbindung **3**. Die Konjugate **2** und **5** zeigten die geringste Melanomtoxizität. Die Proliferation von HeLa und Moris Hepatoma wurde am besten durch das Benzamidkonjugat **3** inhibiert. Melanomselektive Wirkung zeigte keines der Chlorambucilkonjugate.

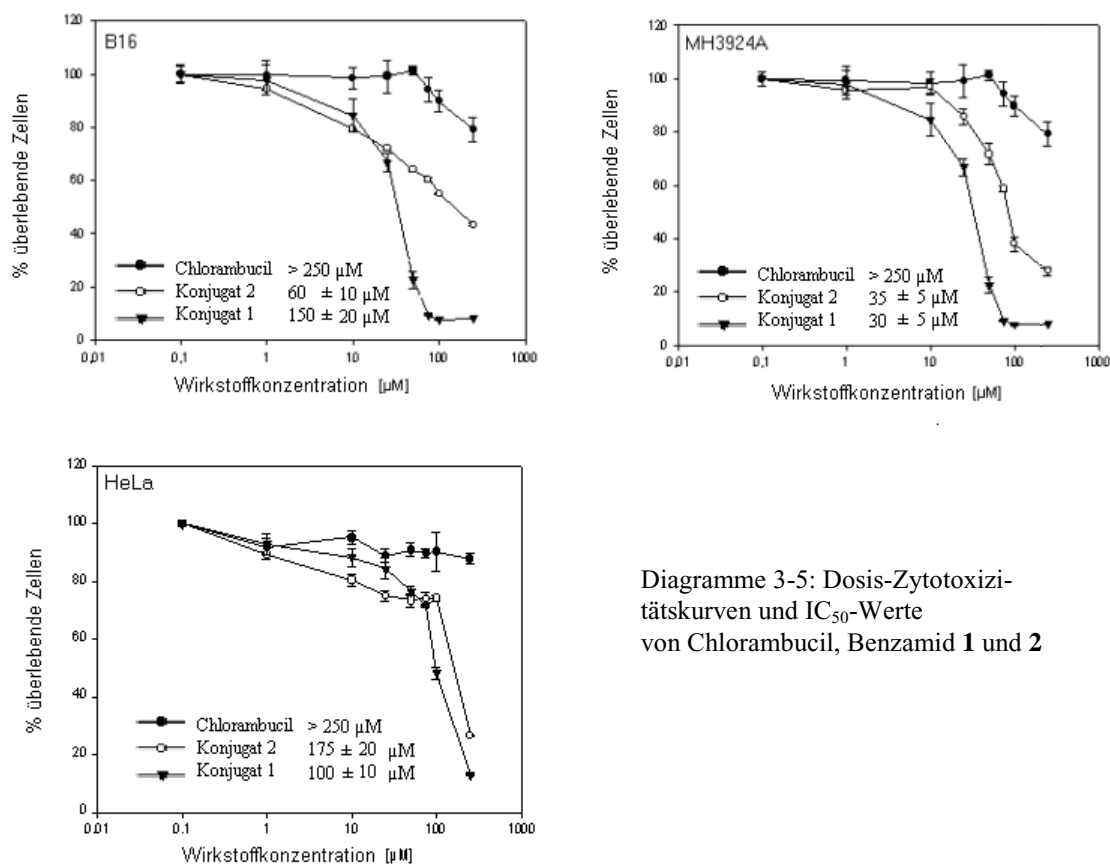


Diagramme 3-5: Dosis-Zytotoxizitätskurven und  $IC_{50}$ -Werte von Chlorambucil, Benzamid **1** und **2**

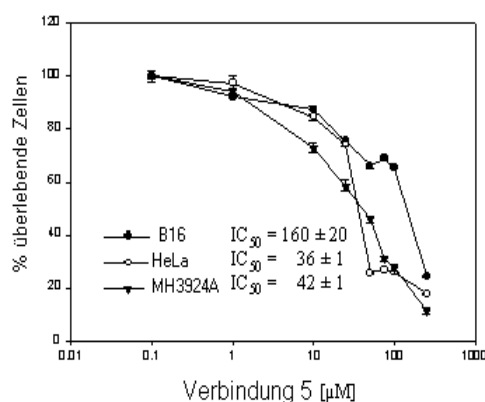
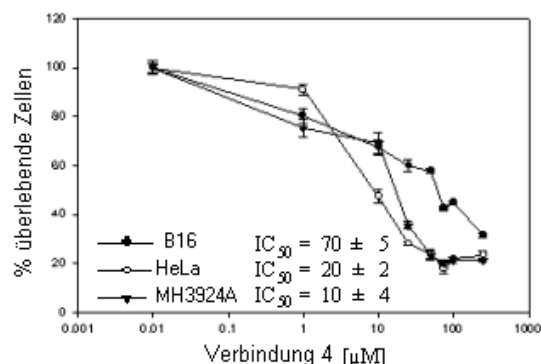
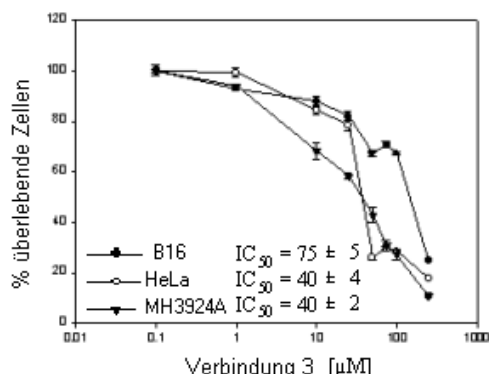
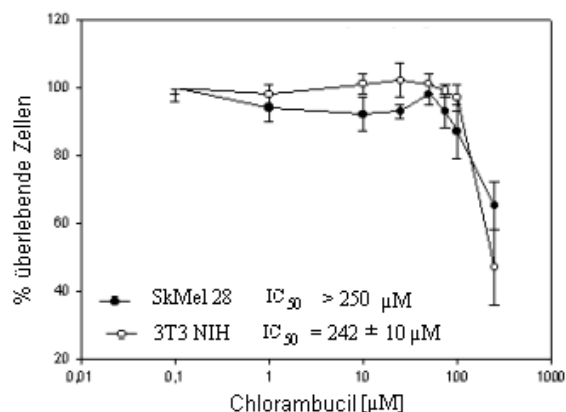


Diagramme 6-8: Dosis-Zytotoxizitätskurven und  $IC_{50}$ -Werte der Chlorambucilkonjugate **3**, **4** und **5**

Darüberhinaus wurden die Konjugate **1**, **2**, **3** und Chlorambucil an der humanen Melanomzelllinie SkMel 28 und an 3T3 NIH (= murine Fibroblasten) getestet. Wieder waren alle Chlorambucilkonjugate toxischer als Chlorambucil. Die Konjugate waren für SkMel28 nur geringfügig toxischer als für 3T3 NIH. Bei einer Chlorambucil-Konzentration von  $242 \pm 4 \mu\text{M}$  wurde bei 3T3 NIH die  $IC_{50}$  erreicht, bei SkMel 28 war sie größer als  $250 \mu\text{M}$ . Das am stärksten wirksame Konjugat war Verbindung **3**, gefolgt vom Chlorambucilkonjugat **1**. Die schwächste Wirkung innerhalb dieser Substanzklasse wies das Zytostatikum **2** auf.



Der Unterschied zwischen SkMel 28 und 3T3 NIH war bei Verbindung **1** am stärksten ausgeprägt, bei Verbindung **3** die Differenz der  $IC_{50}$ -Werte am geringsten. Die Konjugation von Chlorambucil an Benzamide oder Dialkylaminoalkylamine führte nicht zu melanomselektiven Zytostatika. Durch die Konjugation wird allerdings die Zytotoxizität von Chlorambucil verstärkt.

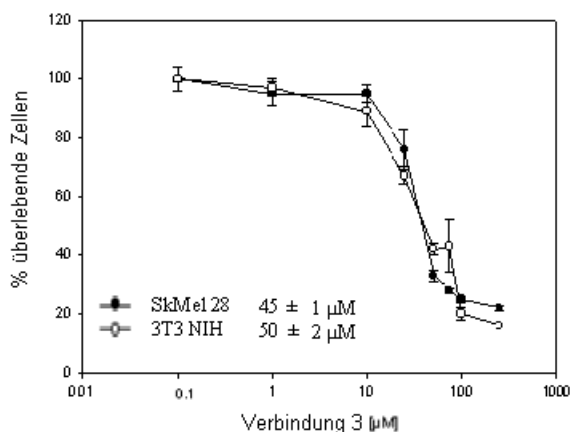
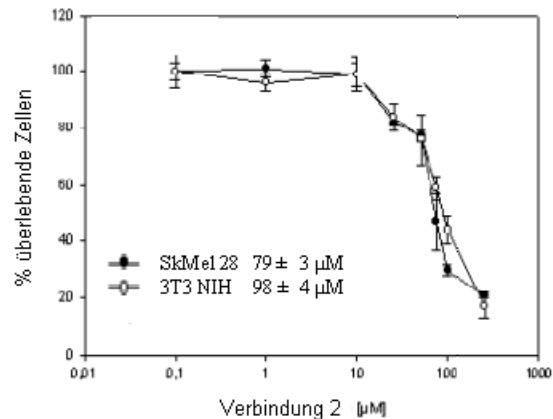
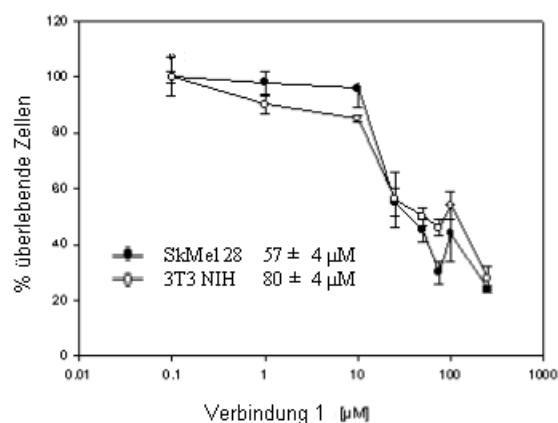


Diagramme 10-12:  
Dosis-Zytotoxizitätskurven  
und  $IC_{50}$ -Werte der Chlorambucilkonjugate **1**, **2** und **3**.

#### 4.2.2.2. Benzamide mit 4-{[Bis-(2-chlorethyl)]amino}-Funktion

Die mit einer 4-{[Bis-(2-chlorethyl)]amino}-Funktion derivatisierten Benzamide zeigten allgemein eine schwächere zytostatische Wirkung als die Chlorambucil-Konjugate trotz der größeren strukturellen Ähnlichkeit mit den in der Melanomszintigrafie verwendeten Benzamiden. Dies könnte durch die zur zytostatisch aktiven Gruppe para-ständige elektronenziehende Säureamidbindung bedingt sein, welche die Elektronendichte am Stickstoff der Chlorethylaminofunktion herabsetzt. Die Fibroblasten sprachen allgemein um den Faktor 2 schwächer auf Verbindung **6** und **7** an als die humanen Melanomzellen. Zwischen MH3924A, B16 und HeLa gab es keine großen Unterschiede. Die Zytostatika waren dennoch, bis auf Verbindung **11** besser wirksam als Chlorambucil.

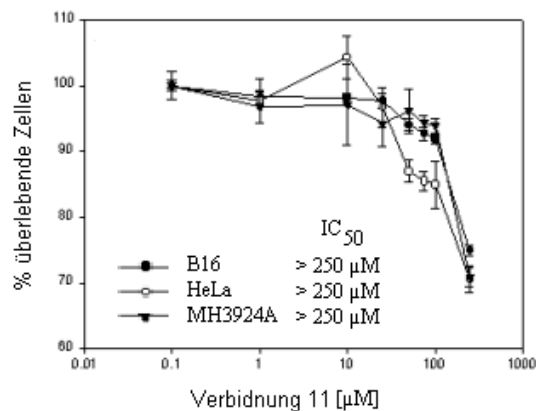
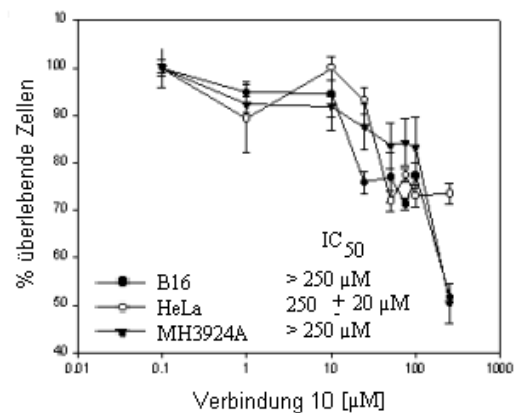
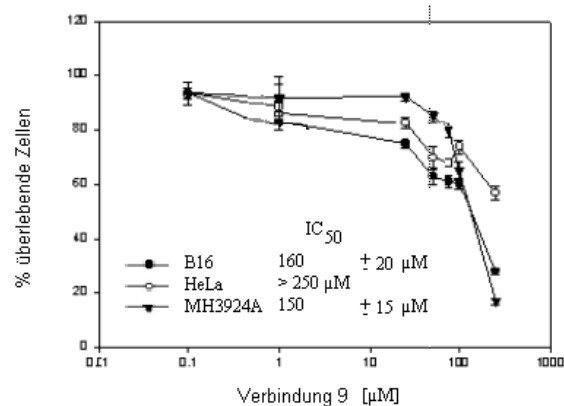
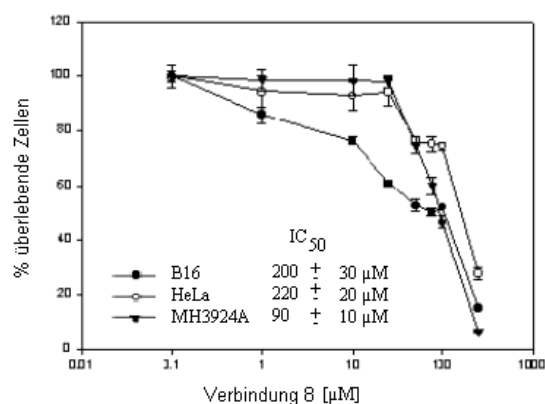


Diagramme 13-16: Dosis-Zytotoxizitätskurven und  $\text{IC}_{50}$ -Werte der Chlorambucilanaloga 8-11.

Verbindung 8 und 9 wurden auch an SkMel 28 und 3T3 NIH getestet. Das Chlorambucilanalogen 9 hatte keinen Einfluß auf 3T3 NIH, wohingegen die  $\text{IC}_{50}$  für SkMel 28 bei  $250 \mu\text{M}$  gerade erreicht wurde. Bei Verbindung 8 lag die  $\text{IC}_{50}$  für SkMel 28 bei  $103 \mu\text{M}$ , für 3T3 NIH bei  $208 \mu\text{M}$ . Die Chlorambucilanaloga zeigten keine melanomspezifische Zytotoxizität und waren weniger potent als die Chlorambucilkonjugate.

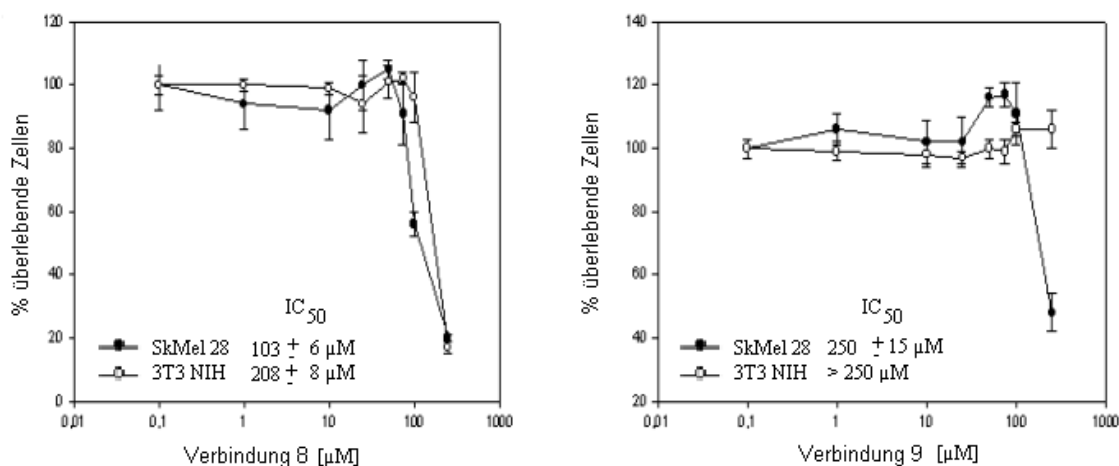


Diagramme 17 und 18: Dosis-Zytotoxizitäts-Kurven Verbindung **8** und **9** (SkMel28 und 3T3 NIH)

#### 4.2.2.3. Benzamide mit Triazenstrukturelement

Drei der synthetisierten Triazenderivate erwiesen sich als stärker wirksam als Dacarbazin. Dies waren Verbindung **16**, **20** und **26**. Verbindung **20** zeigte einen Targetingeffect, wohingegen die Triazene **16** und **26** MH3924A stärker in ihrer Proliferation hemmten. Die meisten Benzamide mit Triazenfunktion waren jedoch völlig wirkungslos. Die Triazene sind Prodrugs, die durch eine oxidative Desalkylierung in die wirksame Form überführt werden. [97] Es könnte sein, dass die schlecht wirkenden Triazene schlechte Substrate für diejenigen Enzyme sind, die für die Bioaktivierung verantwortlich sind. Bei Testung von **17**, **18**, **22**, **23**, **24** und **25** wurde nicht DMSO sondern Methanol als Lösungsmittel verwendet, weil nicht alle Verbindungen in DMSO löslich waren. Es könnte daher zu einer möglichen Konkurrenz des Zytostatikums mit dem Lösungsmittel um das Enzym gekommen sein. In B16 Melanomzellen könnte die melanosomale Tyrosinase an der Aktivierung beteiligt sein. Darüberhinaus werden bestimmte Isoformen von Cytochrom P450 in Tumorzellen exprimiert [98], so dass diese Enzyme ebenfalls an der Bioaktivierung der Triazene beteiligt sein könnten. Die längere Inkubationszeit - im Vergleich zu den anderen Verbindungen - war erforderlich, weil die Bioaktivierung der Verbindungen eine gewisse Zeit benötigt. Denn bei einstündiger Inkubation der Zellen mit den Substanzen, kam es zu keiner nennenswerten Proliferationshemmung.

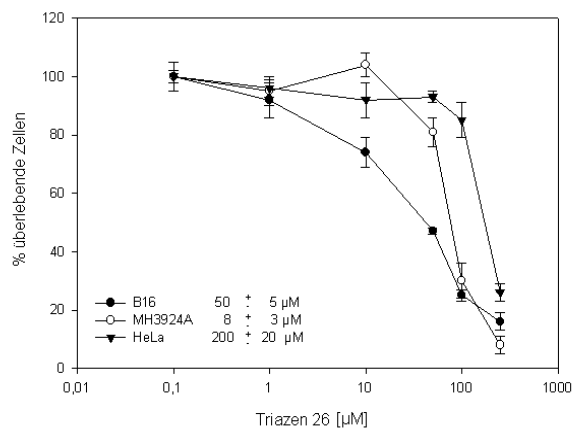
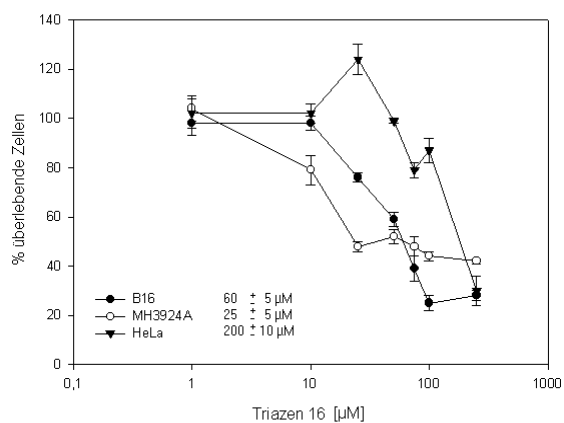
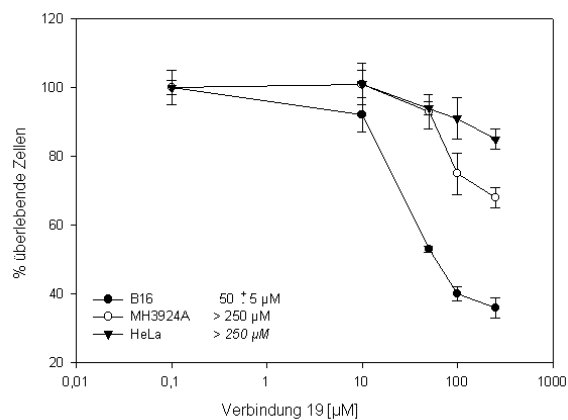
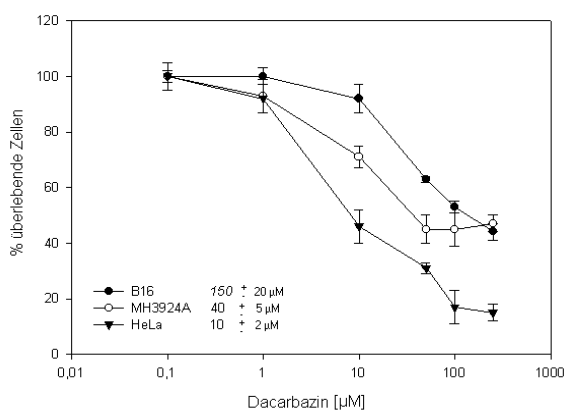


Diagramme 19-22: Dosis-Zytotoxizitätskurven von Dacarbazin und der Triazene **16**, **19** und **26** sowie von Dacarbazin.

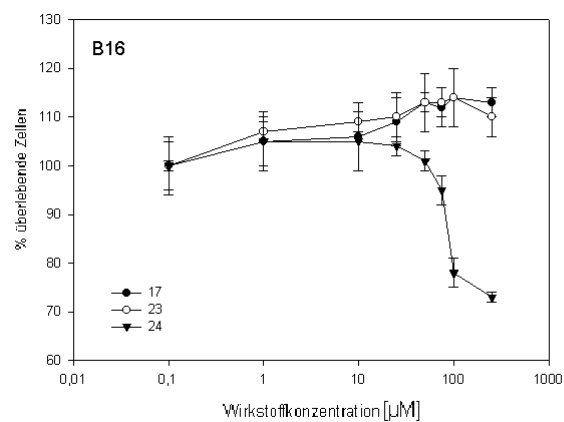
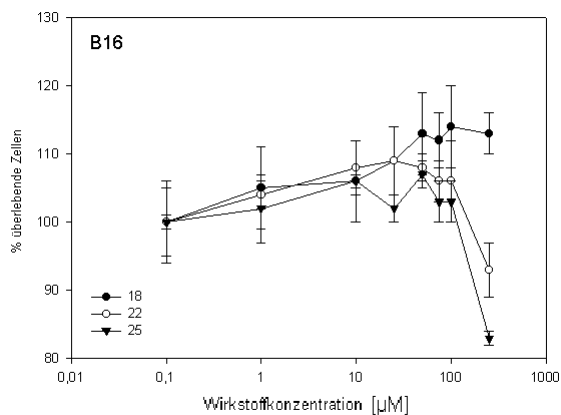


Diagramme 23-24: Dosis-Zytotoxizitätskurven der Triazene **17**, **18**, **22**, **23**, **24** und **25**.



Für SkMel 28 Melanomzellen waren die Benzamidtriazene **16**, **19** und **26** wesentlich toxischer als für 3T3 NIH. Die  $IC_{50}$  von Dacarbazin war für Fibroblasten und SkMel 28 größer als  $250 \mu\text{M}$ . Für das Bis-Triazen **26** lag die  $IC_{50}$  mit  $23 \mu\text{M}$  bei SkMel 28 am niedrigsten von allen an dieser Zelllinie getesteten Verbindungen. Bei 3T3 NIH wurde erst bei einer 4,3-fach höheren Konzentration erreicht. Lediglich Verbindung **20** zeigte eine Melanomselektivität. Möglicherweise ist dieses Triazen ein besseres Substrat für die Tyrosinase als für andere bioaktiverende Enzyme. Im Folgenden werden die Diagramme mit den Dosis-Wirkungs-Beziehungen dargestellt.

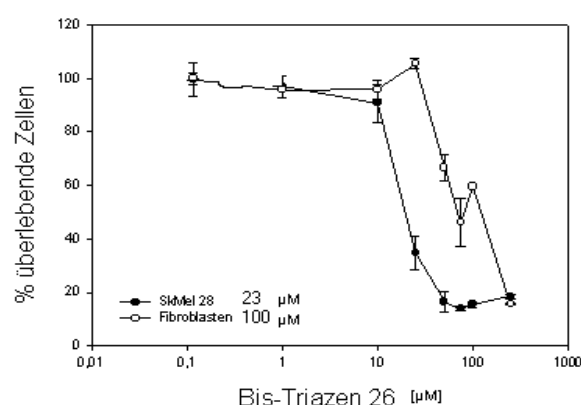
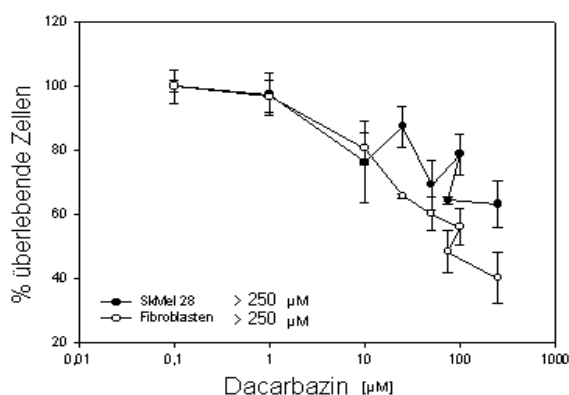
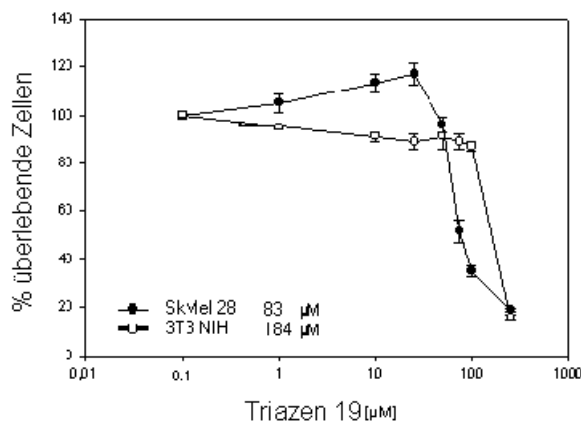
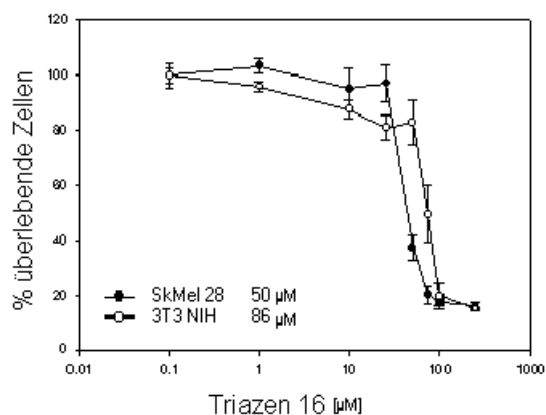


Diagramme 25 und 26: Dosis-Wirkungsbeziehung: Dacarbazin und Triazen **26**



Dosis-Wirkungsbeziehung der Triazene **16** und **19**

#### 4.2.2.4. Anthracyclinderivat

Das Anthracyclinderivat war zwar zytostatisch aktiv, es gab aber keine nennenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. Durch die Konjugation an ein Benzamid wurde keine melanomselektive Zytotoxizität erzielt. Die  $IC_{50}$  des nicht derivatisierten Anthracyclins wurde nicht getestet, weil die Konjugate keine selektive Melanomzytotoxizität aufwiesen.

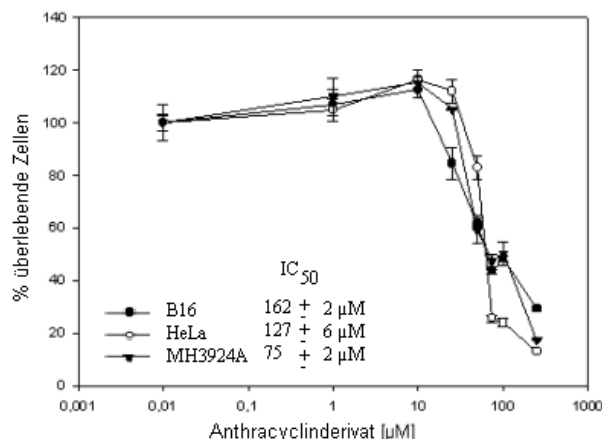


Diagramm 29: Dosis-Zytotoxizitätskurve und  $IC_{50}$ -Werte des Anthracyclinderivates **28**

#### 4.2.2.5. Kupfer-Dithiocarbamat

Farmer et al. beschreiben die Melanomtoxizität von  $Cu^{2+}$ - und  $Zn^{2+}$ -Kationen für Melanome, wobei Melanozyten von diesen Kationen erst bei sehr viel höheren Konzentrationen abgetötet werden. Um diese Metallkationen in Melanomzellen zu schleppen, wurden diese mit Dithiocarbamten komplexiert. Die Metallkationen lösen oxidativen Streß in den Melanomzellen aus. [78] Dies war der Grund für die Synthese und Testung eines Dithiocarmates, dass ein Benzamidstrukturelement enthält. Die Hoffnung war, eine noch bessere Anreicherung der Metallkationen im Melanosom zu erzielen, und vor allem eine Melanomspezifität. Die Erwartungen erfüllten sich jedoch nicht. Vor allem wies der Vergleichskomplex mit einer  $IC_{50}$  von  $15 \mu M$  eine größere Toxizität für B16 Melanomzellen auf.

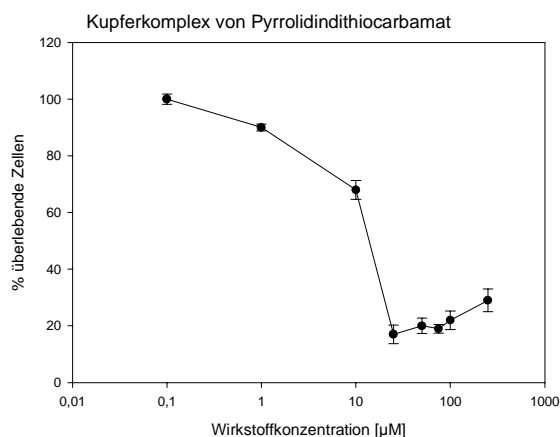
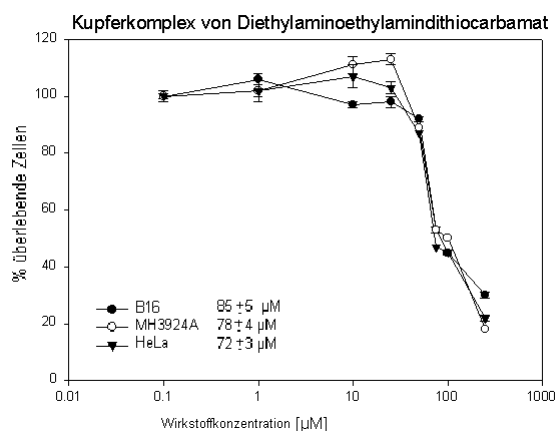


Diagramm 30 a, b: Dosis-Wirkungs-Kurve des Kupfer-Dithiocarbamates und der Vergleichskomplexes

#### 4.2.2.6. Benzamid-Methotrexat-Konjugate

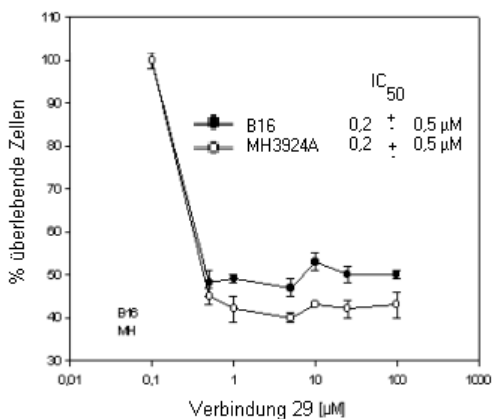
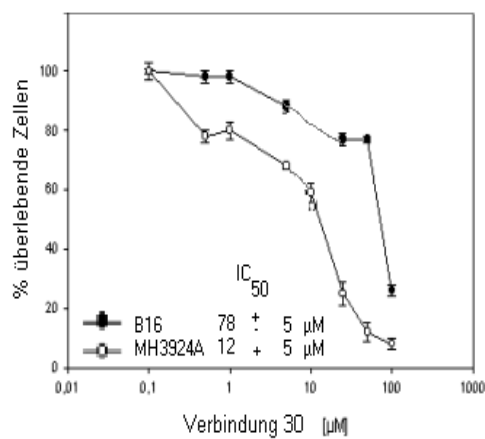
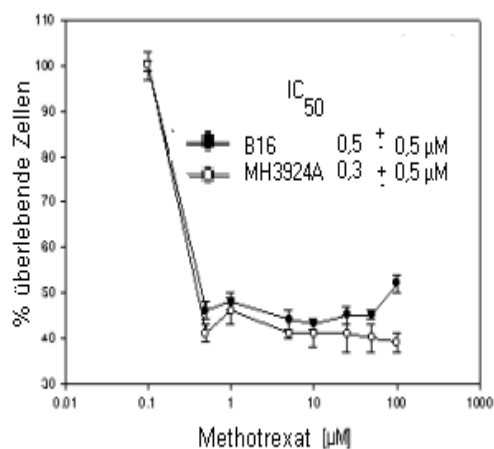


Diagramme 31-33: Dosis-Zytotoxizitätskurve und IC<sub>50</sub>-Werte von Methotrexat und den MTX-Konjugaten 30 und 29.

Die  $IC_{50}$  lag für Methotrexat bei B16 und MH3924A bei sehr niedrigen Konzentrationen. Die Konjugation von Morpholinoethylamin an die  $\alpha$ -Carboxylgruppe (Verbindung **29**) brachte keine Verbesserung der Wirkung gegenüber nichtderivatisiertem MTX. Wurden beide Carboxylgruppen derivatisiert, dann war die Wirkung generell gegenüber MTX verschlechtert, wobei B16 am wenigsten stark auf die Verbindung ansprach. Für die Wirksamkeit ist eine freie  $\gamma$ -Carboxylgruppe notwendig. Bei dem Bis-Konjugat muss daher die Säureamidbindung zwischen der  $\gamma$ -Carboxylgruppe und dem Procainamid hydrolysiert werden. MH3924A scheint dies besser zu können als B16.

#### 4.2.2.7. Platinkomplex mit Benzamidchelatligen

Der Platinkomplex von 4-[2,3-(Diaminopropionyl)amino]-*N*-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid war zytostatisch inaktiv.

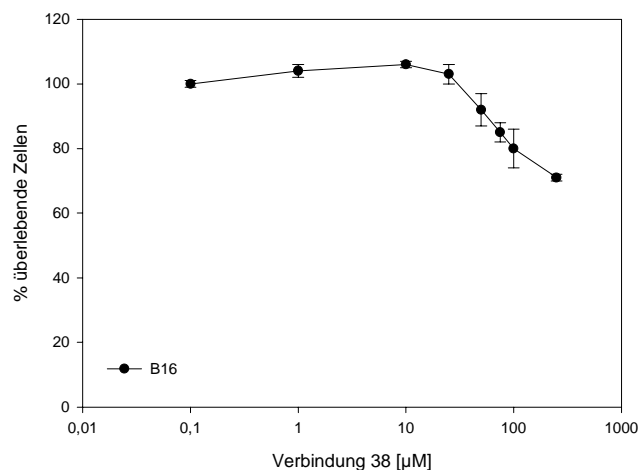


Diagramm 34: Dosis-Wirkungs-Beziehung des Platinkomplexes von 4-[2,3-(Diaminopropionyl)amino]-*N*-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid

### 4.2.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessungen

Tabelle IC <sub>50</sub> -values [ $\mu$ M] <sup>1</sup> erhalten mit dem MTS Viabilitätsassay						
Verbindung	B16	SKMel28	3T3NIH	MH3924A	HeLa	Inkubationszeit [h] <sup>2</sup>
<b>Chlorambucil</b>	> 250	> 250	243 $\pm$ 10	> 250	> 250	1
<b>1</b>	60 $\pm$ 10	57 $\pm$ 4	80 $\pm$ 4	35 $\pm$ 5	100 $\pm$ 10	1
<b>2</b>	150 $\pm$ 20	79 $\pm$ 3	98 $\pm$ 5	30 $\pm$ 5	175 $\pm$ 20	1
<b>3</b>	75 $\pm$ 10	45 $\pm$ 1	50 $\pm$ 2	40 $\pm$ 5	40 $\pm$ 5	1
<b>4</b>	70 $\pm$ 5	n.b.	n.b.	10 $\pm$ 4	20 $\pm$ 2	1
<b>5</b>	160 $\pm$ 20	n.b.	n.b.	42 $\pm$ 1	36 $\pm$ 1	1
<b>8</b>	200 $\pm$ 30	103 $\pm$ 6	208 $\pm$ 8	90 $\pm$ 10	220 $\pm$ 20	1
<b>9</b>	160 $\pm$ 20	250 $\pm$ 15	> 250	150 $\pm$ 15	> 250	1
<b>10</b>	> 250	n.b.	n.b.	> 250	250 $\pm$ 20	1
<b>11</b>	> 250	n.b.	n.b.	> 250	> 250	1
<b>15</b>	>250	n.b.	n.b.	>250	>250	1
<b>Dacarbazin</b>	150 $\pm$ 20	> 250	> 250	40 $\pm$ 5	10 $\pm$ 2	24
<b>16</b>	60 $\pm$ 5	50 $\pm$ 2	86 $\pm$ 4	25 $\pm$ 5	200 $\pm$ 20	24
<b>17</b>	> 250	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	24
<b>18</b>	> 250	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	24
<b>19</b>	50 $\pm$ 5	83 $\pm$ 3	184 $\pm$ 4	> 250	> 250	24
<b>22</b>	> 250	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	24
<b>23</b>	> 250	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	24
<b>24</b>	> 250	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	24
<b>25</b>	> 250	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	24
<b>26</b>	50 $\pm$ 5	23 $\pm$ 1	100 $\pm$ 3	8 $\pm$ 3	200 $\pm$ 20	24
<b>28</b>	162 $\pm$ 2	n.b.	n.b.	75 $\pm$ 2	127 $\pm$ 6	1
<b>Methotrexat</b>	0,5 $\pm$ 0,5	n.b.	n.b.	0,3 $\pm$ 0,5	n.b.	1
<b>29</b>	0,2 $\pm$ 0,5	n.b.	n.b.	0,2 $\pm$ 0,5	n.b.	1
<b>30</b>	78 $\pm$ 5	n.b.	n.b.	12 $\pm$ 5	n.b.	1
<b>31</b>	85 $\pm$ 5	n.b.	n.b.	78 $\pm$ 5	72 $\pm$ 5	24
<b>32</b>	> 250	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	24

<sup>1</sup>)Dreifachbestimmungen; Mittelwert aus diesen Messungen; <sup>1</sup>) Inkubationszeit  
n.b. = nicht bestimmt

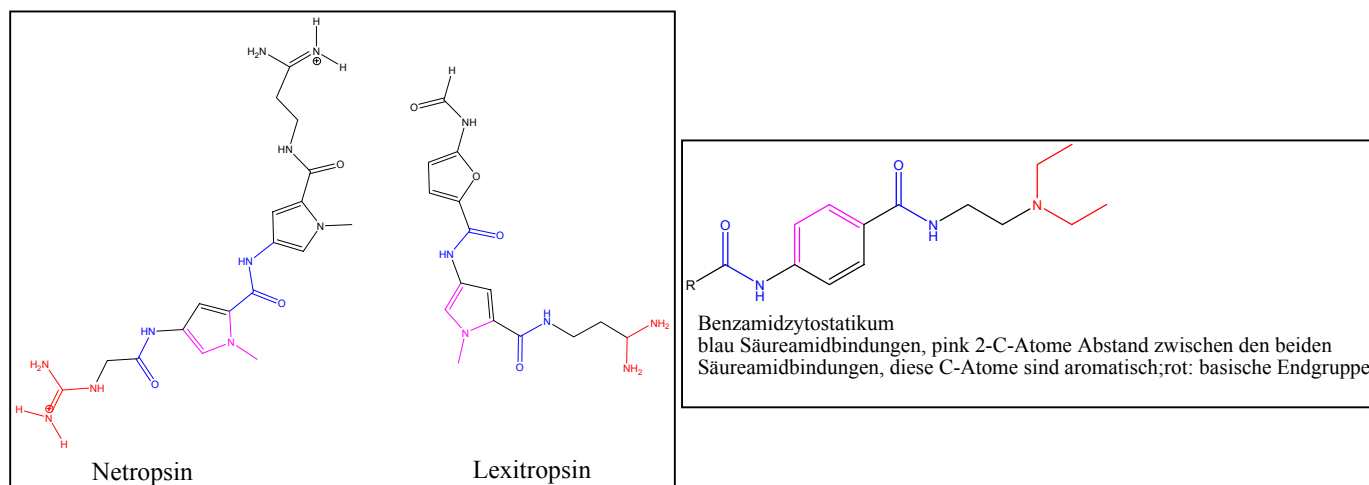
### **4.3. Theorie über die generell verbesserte Wirksamkeit der Benzamidzytostatika im Vergleich zu Chlorambucil und Dacarbazin**

Die in vitro und in vivo Anreicherung der Benzamidzytostatika in B16 Melanomzellen wurde experimentell bewiesen. In Morris Hepatoma Zellen erfolgte dahingegen keine Anreicherung der Benzamidzytostatika. Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessungen stehen in Diskrepanz zum Anreicherungsverhalten der Verbindungen in den Zelllinien. Alle Verbindungen wirkten stärker in der Zelllinie, in der keine Anreicherung der Benzamidderivate zu verzeichnen war. Darum lässt sich schließen, dass die verbesserte Wirkung der Benzamidzytostatika nicht auf die Anreicherung in B16 Melanomen zurückzuführen ist, sondern auf einem anderen Mechanismus basiert.

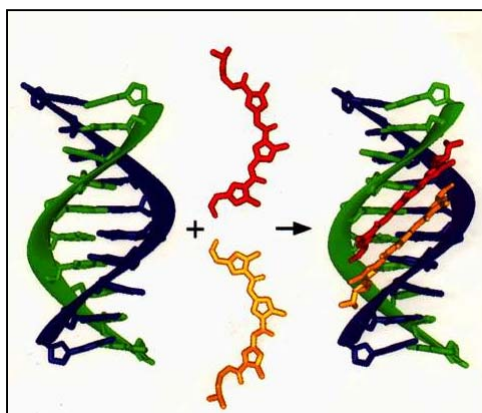
#### **4.3.1. Erklärungsversuch für die verbesserte Wirkung von alkylierenden Benzamidzytostatika im Vergleich mit Chlorambucil und Dacarbazin**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Arten von Benzamidzytostatika synthetisiert; solche, deren Wirkung durch die Bindung an die DNS zustande kommt, und andere, deren Wirkmechanismus nicht auf der Bindung an die DNS beruht. Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchungen zeigten, dass durch die Verknüpfung der DNS-bindenden Zytostatika Chlorambucil und Dacarbazin mit einem Benzamid eine Verbesserung der Wirkung im Vergleich zu den nicht derivatisierten DNS-bindenden Zytostatika erzielt werden konnte. Die Konjugation von Benzamiden mit Methotrexat, einem Zytostatikum, das nicht an die DNS bindet, sondern ein Enzym inhibiert, führte dahingegen nicht zu einer Verbesserung der Wirkung gegenüber Methotrexat, sondern bei Konjugation an die  $\gamma$ -Carboxylgruppe sogar zu einer Verschlechterung der proliferationshemmenden Wirkung.

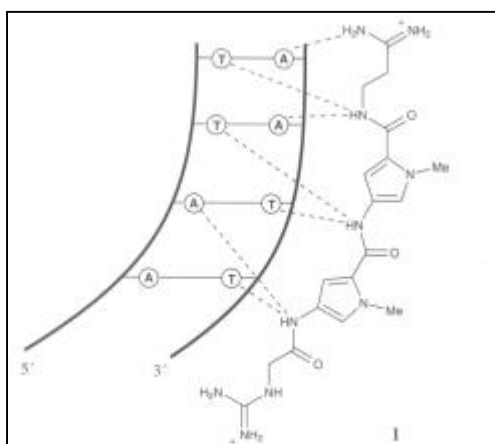
Es ist bekannt, dass eine Reihe von Verbindungen in der Lage ist, mit der DNS zu interagieren. Dabei muss differenziert werden zwischen den reversibel (= Stoffe, die kovalent an die DNS binden) und den irreversibel an die DNS bindenden Molekülen (=Stoffe, die keine kovalente Bindung mit der DNS eingehen). Bei der reversiblen Bindung kann unterschieden werden zwischen Substanzen, die mit der DNS interkalieren, und solchen, die mit der kleinen Furche der DNS einen Komplex bilden. Besonderes Augenmerk, im Zusammenhang mit der Theorie über die verbesserte Wirksamkeit der Benzamidzytostatika im Vergleich zu den unveränderten Zytostatika, gilt den Stoffen, die mit der kleinen Furche der DNS wechselwirken. Dabei handelt es sich strukturell gesehen um aromatische Verbindungen, die über Wasserstoffbrückendonatoren miteinander verknüpft sind wie z.B. Carboxamide, und die zusätzlich eine kationische Endgruppe besitzen. Es werden dabei zum einen Wasserstoffbrücken mit DNS-Basen ausgebildet, und die kationische Gruppe wechselwirkt mit dem Zucker-Phosphat-Band der DNS. Das Pyrrolantimykotikum Distamycin ist ein Vertreter dieser Substanzklasse. Einige dieser Verbindungen können die Topoisomerase I hemmen. [100] Das Formelbild 27 zeigt beispielhaft zwei Vertreter aus der Verbindungsklasse der Polyamide und ein Benzamidzytostatikum. Die strukturellen Ähnlichkeiten sind farblich markiert. Verblüffend ist die strukturelle Ähnlichkeit der Verbindungen.



Formelbild 27: Die Strukturformeln zweier Polyamide, die über Wasserstoffbrücken und eine kationische Endgruppe an der kleinen Furche der DNS binden,[101] und die eines Benzamidzytostatikums werden dargestellt.



Formelbild 28: Bindung von zwei verschiedenen Polyamiden an die kleine Furche der DNS. [102]



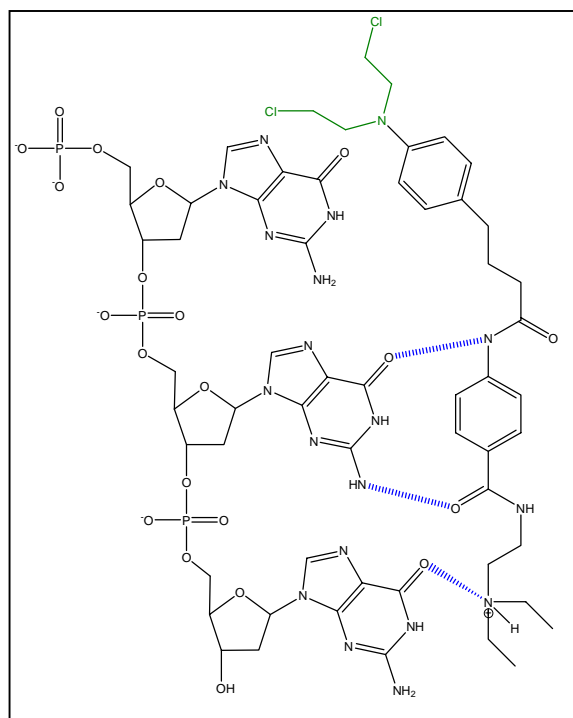
Formelbild 29.: Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem Polyamid und den DNS-Basen in der kleinen Furche der DNS. [103]

Da die Benzamidzytostatika, insbesondere diejenigen mit zwei Säureamidbindungen im Molekül, eine große strukturelle Ähnlichkeit zu den oben beschriebenen DNS-Liganden besitzen (vgl. Formelbild 29), könnte die verbesserte Wirkung der alkylierenden Benzamidzytostatika auf einer höheren DNS-Affinität dieser Benzamidzytostatika im Vergleich zu Chlorambucil oder Dacarbazin beruhen. Benzamidzytostatika verfügen über Wasserstoffbrückendonatoren, mit denen sie an die kleine Furche der DNS binden könnten. Darüberhinaus verfügen sie über eine basische Endgruppe, die unter physiologischen Bedingungen kationisch vorliegt. Diese Endgruppe ermöglicht die Bindung an das anionisch vorliegende Zucker-Phosphat-Band oder über Ion-Dipol-Wechselwirkungen an die DNS-Basen.

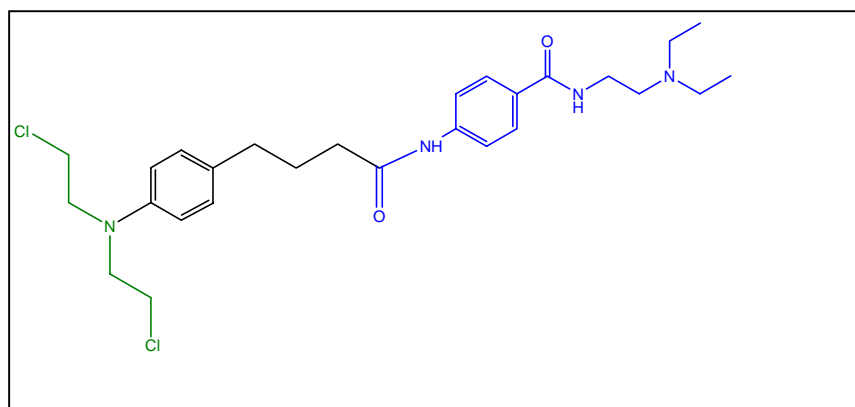
Aber auch folgender Mechanismus könnte zugrunde liegen. Während der Replikation der DNS und auch bei der Transkription von Genen liegt einzelsträngige DNS vor. Benzamidzytostatika könnten durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken und durch Ion-Dipol-Wechselwirkungen an einen DNS-Einzelstrang gebunden werden. Dies würde dazu führen, dass die weitere Replikation gehemmt wäre. Zusätzlich dazu wäre die alkylierende Gruppe in der Nähe der nukleophilen Zentren der DNS fixiert, was zu einer effizienteren Alkylierung der DNS im Vergleich zu anderen Zytostatika führen sollte.

Chlorambucil oder Dacarbazin würden nicht so gut gebunden, da sie theoretisch gesehen weniger Möglichkeiten hätten mit der DNS zu interagieren. Beide könnten theoretisch nur eine Wasserstoffbrücke ausbilden. Alle Benzamidzytostatika verfügen demzufolge über einen Molekülteil, der die DNS-Affinität bedingt und über einen, der für die Alkylierung der DNS verantwortlich ist.





Formelbild 30: Benamidzytostatika (hier an Verbindung **1** demonstriert) könnten durch Wasserstoff-Brücken und Ion-Dipol-Wechselwirkungen (beide blau) reversibel an der DNS gebunden werden. Dadurch würde die alkylierende Gruppe in der Nähe der DNS-Base fixiert (in diesem Fall N7 von Guanin; dieses N-Atom wird von Chlorambucil bevorzugt alkylert).



Formelbild 31: alkylierende Gruppe (grün); für die DNS-Bindung verantwortliche Gruppe (blau)

#### 4.3.2. Bestimmung der DNS-Affinität von Benzamiden

Geall et. al untersuchten mit Hilfe des Ethidiumbromid-Ausschluß-Assays das Ausmaß der DNS-Bindung von DNS-Liganden. Kälberthymus-DNS wird mit den Testsubstanzen inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit werden die Lösungen mit Ethidiumbromid versetzt, das dann mit der DNS interkaliert. An die DNS gebundenes Ethidiumbromid fluoresziert. Je mehr der Testsubstanz gebunden wurde, desto weniger Ethidiumbromid kann gebunden werden und desto geringer ist die Fluoreszenzausbeute. Ethidiumbromid wird auf zwei verschiedene Arten an die DNS gebunden: 1) Interkalation und 2) elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem kationisch vorliegenden Ethidiumbromid und anionischen Phosphatgruppen auf der Oberfläche

der DNS. Dies macht sich besonders bemerkbar bei hoher Ethidiumbromidkonzentration und niedriger Salzkonzentration. Nicht an die DNS gebundenes Ethidiumbromid zeigt nur geringe Fluoreszenz, weil das Lösungsmittel zu einem Quenching führt. Auch zur Messung des Ausmaßes der Alkylierung der DNS durch ein Zytostatikum ist diese Methode geeignet, weil durch die Alkylierung der Zahl der Bindungsstellen für Ethidiumbromid abnimmt. Der Ethidiumbromid-Austausch-Assay ist eine valide Methode zur Bestimmung des Ausmaßes der DNS-Bindung interkalierender und nicht interkalierender Substanzen. [104] Diese Methode weist die DNS-Bindung nur indirekt nach.

#### 4.3.3. Ergebnisse des Ethidiumbromid-Austausch-Assays

Um das Ausmaß der DNS-Bindung festzustellen, wurde doppelsträngige Kälberthymus-DNS mit verschiedenen Benzamidzytostatika, Chlorambucil und Dacarbazin inkubiert. Die Fluoreszenzausbeute nach Zugabe von Ethidiumbromid und nach Beendigung der Inkubationszeit wurde ermittelt. Je niedriger die Fluoreszenzausbeute ist, desto größer ist die DNS gebundene Zytostatikummenge. Als Kontrolle diente zum einen DNS mit Ethidiumbromid. Hier wurde die beste Fluoreszenzausbeute erzielt. Zum anderen zeigten Kontrollen, die nur DNS und Substanz oder nur Substanz und Ethidiumbromid enthielten kaum Fluoreszenz.

Dacarbazin zeigte die geringste DNS-Bindung der getesteten Triazene. Am besten wurde Verbindung **26** gebunden. Fast genauso gut gebunden wurde Verbindung **16**. Dacarbazin besitzt nur eine Säureamidbindung. Alle Benzamidzytostatika mit Triazenstruktur weisen dahingegen noch zusätzlich eine unter physiologischen Bedingungen kationisch vorliegende Endgruppe auf und damit eine Bindungsstelle mehr. Verbindung **26** hat sogar drei Bindungsstellen mehr als Dacarbazin. Dies scheint aber gegenüber der DNS-Affinität des Monotriazens **16** keine großen Unterschiede zu bewirken. Da die Triazene Prodrugs sind, wurde nicht das Ausmaß der Alkylierung bestimmt, sondern die Fähigkeit reversibel an die DNS zu binden.

Die Chlorambucil-Konjugate und Chlorambucilanaloge binden stärker an die DNS als Chlorambucil aber etwas weniger stark als die beiden auf ihre DNS-Affinität hin getesteten Triazenderivate **16** und **26**. Alle Benzamidzytostatika besitzen eine basische Endgruppe und eine Säureamidbindung. Damit sind mehr potentielle DNS-Bindungsstellen vorhanden als bei Chlorambucil. Die DNS-Affinität von Verbindung **1** ist größer als die von Verbindung **8**. Chlorambucil weist die geringste DNS-Affinität auf.

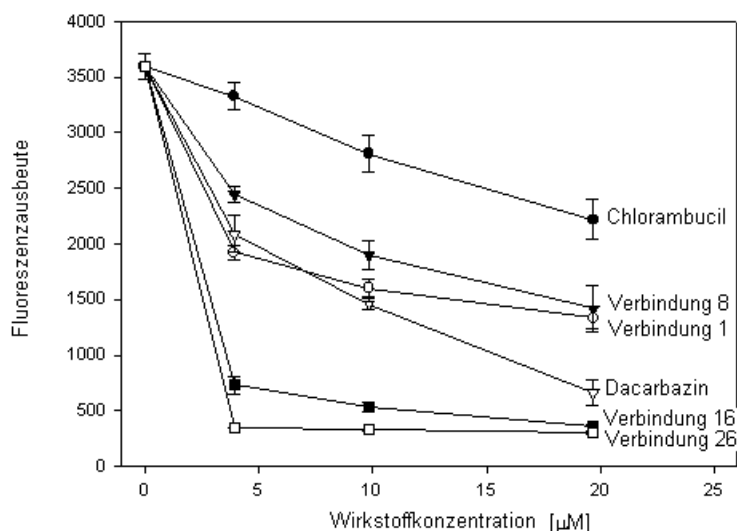


Diagramm 35: Verminderung der Fluoreszenzausbeute durch die Benzamidzytostatika **1, 8, 16, 26** sowie der Zytostatika **Chlorambucil** und **Dacarbazin**

Diese Ergebnisse erklären dennoch nicht, wieso bei B16 Melanomzellen die Wirkung der Benzamidzytostatika bei den Melanomzellen weniger gut ist als bei den anderen Krebszelllinien.

#### 4.4. Abfangtheorie

Die schlechtere Wirkung von Benzamidzytostatika bei B16 Melanomzellen im Vergleich zu MH3924A-Zellen kommt wohl dadurch zustande, dass ein Teil der Zytostatikamoleküle den Zellkern der B16 Melanomzellen, den Wirkort, nicht erreicht, weil er vorher abgefangen wird. Es war naheliegend, dass das intramelanosomale Melanin als Scavenger fungiert. In der Literatur gibt es zahlreiche Berichte über die hohe Affinität von schwach basischen Stoffen zu Melanin [53,54,55,56]. Der saure intramelanosomale pH-Wert begünstigt die Bindung an das als Polyanion vorliegende Melanin. [52] Die Benzamidzytostatika können durch passive Diffusion in das Melanosom gelangen.[60] Dort heben sie den intramelanosomalen pH-Wert an und werden dabei protoniert. In der protonierten Form können sie nicht mehr aus dem Melanosom diffundieren, und darüberhinaus werden sie an Melanin gebunden. Die Benzamidzytostatika sollten - aufgrund ihres basischen Charakters -den intramelanosomalen pH-Wert anheben. Durch den Anstieg des pH-Wertes steigt die Tyrosinaseaktivität, deren Optimum bei pH = 6,8 liegt, was die vermehrte Bildung von Melanin nach sich zieht. [105] Die Zahl der Bindungsstellen ist sehr hoch [60], so dass es selbst bei gleichzeitiger oder zeitversetzter Gabe eines anderen melaninaffinen Stoffes nicht zu einem verminderten Abfangen des Benzamidzytostatikums kommt. Dieser zweite Teil der Theorie, der als Abfangtheorie bezeichnet wurde, sollte durch folgende Experimente geprüft werden. Zum einen wurde die Melaninaffinität der Benzamidzytostatika geprüft, es sollte der Anstieg des intramelanosomalen pH-Wertes mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden, der Nachweis des Anstiegs der Tyrosinaseaktivität und des Melaningehaltes durch das Benzamidzytostatikum sollte ebenfalls

erbracht werden. Im Folgenden werden die experimentellen Ergebnisse zum Nachweis dieser Theorie abgehandelt.

#### 4.4.1. Nachweis der hohen Bindungskapazität der Benzamide an B16 Melanome

*N*-Acetylprocainamid und Benzamidzytostatika weisen eine hohe Melaninaffinität auf. Durch die zeitgleiche Gabe des ebenfalls melaninaffinen *N*-Acetylprocainamids sollte ein Teil der Bindungsstellen am Melanin durch dieses Benzamid belegt werden, so dass weniger Bindungsstellen für das Benzamidzytostatikum **1** zur Verfügung stünden. Damit sollte die Konzentration des Benzamidzytostatikums **1** im Zellkern zunehmen, was zu einer stärkeren Proliferationshemmung führen sollte.

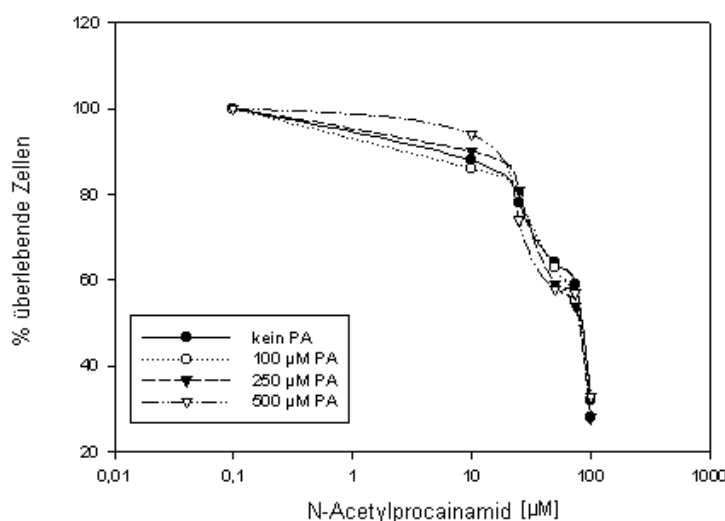


Diagramm 36: Dosis-Wirkungs-Beziehung von Verbindung **1** bei zunehmender Konzentration von *N*-Acetylprocainamid

Es zeigte sich, dass der Kompetitor *N*-Acetylprocainamid, auch wenn er in sehr großem Überschuß gegeben wurde, nicht dazu führte, dass das Benzamidzytostatikum **1** besser wirkt. Es muss daher unverändert viel von Verbindung **1** gebunden worden sein.

Daraus geht hervor, dass die Zahl der Bindungsstellen sehr groß ist. Dies steht im Einklang mit einem von Eisenhut et al. durchgeführten Versuch, bei dem keine Sättigung bei der Melanomaufnahme von radioiodierten Benzamiden beobachtet wurde, obwohl sich die spezifische Aktivität (ein Maß dafür, wie viele der vorhandenen Moleküle radioaktiv markiert sind) der Substanzen verringerte. Dabei wurde den radioiodierten Benzamiden eine zunehmend größere Menge nicht radioaktiver Benzamide zugesetzt, die beide um die Bindungsstelle konkurrieren. Die Menge an gebundener Radioaktivität war dabei unverändert.

#### 4.4.2. Melaninaffinität der Benzamidzytostatika – Bestimmung der Bindungsisothermen

Um die relativen Melanin-Bindungskapazitäten der Benzamidzytostatika zu ermitteln, wurde synthetisches Melanin bei pH 4 (physiologischer intramelanosomaler pH-Wert) mit unterschiedlichen Konzentrationen des Benzamidzytostatikums inkubiert und der nicht an das Melanin gebundene Anteil bestimmt. Von den getesteten Zytostatika wurde das Chlorambucilanalogon **8** am stärksten gebunden, gefolgt vom Mono-Triazen **16**. Benzamid **1** und Benzamid **26** haben fast die gleiche Melaninaffinität. Beide Verbindungen wurden weniger stark an Melanin gebunden als das Triazen **16**. Dacarbazin und Chlorambucil werden nur zu einem geringen Anteil an Melanin gebunden.

Die Reihenfolge der Melaninbindung steht im Einklang mit der Reihenfolge der  $IC_{50}$ -Werte, die für die Benzamidderivate gefunden wurden. Verbindung **26** und **1** waren für B16 Melanomzellen am stärksten zytostatisch aktiv, Verbindung **8** war das am schwächsten wirksame Zytostatikum der vier Benzamide, deren Melaninaffinität ermittelt wurde. Die etwas geringere Melaninbindung der Verbindungen **1** und **26** im Vergleich zu den Benzamiden **16** und **8** führt dazu, dass ein größerer Anteil dieser Verbindungen in den Zellkern gelangt und damit die zytostatische Wirkung größer ist als bei den stärker an Melanin gebundenen Benzamiden. Je größer die Melaninaffinität ist, desto geringer ist die Zytotoxizität der Benzamidzytostatika.

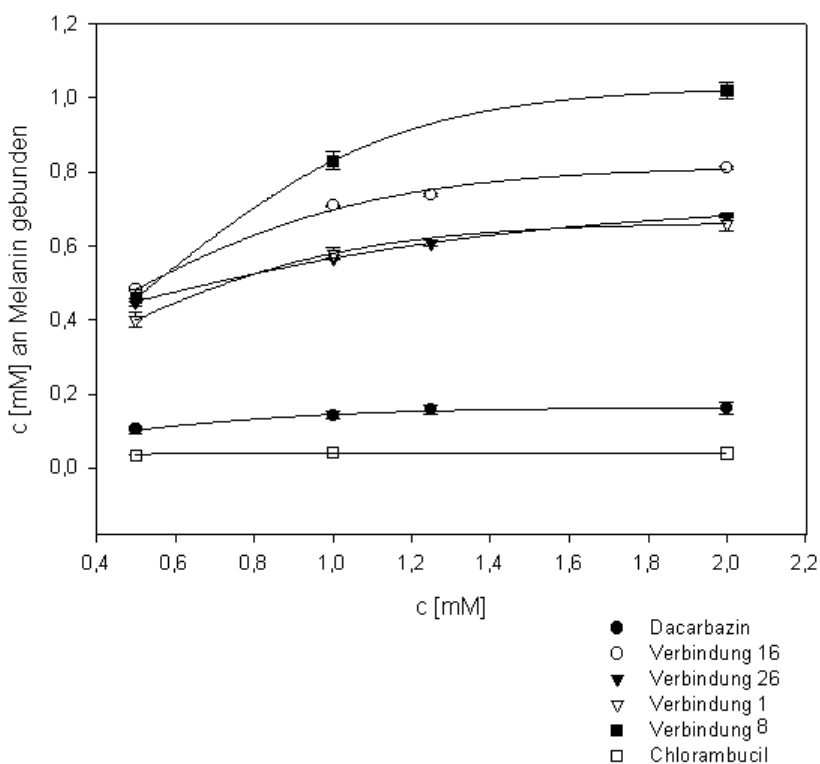


Diagramm 37: Affinität der Benzamidderivate **1**, **8**, **16**, **26** sowie **Chlorambucil** und **Dacarbazin** zu synthetischem Melanin

#### 4.4.3. Einfluß von Melanin auf die Zytotoxizität von Benzamidzytostatika

Der Einfluß von Melanin auf die Bioverfügbarkeit der Benzamidkonjugate wurde mittels des MTS Zellproliferationsassays untersucht. MH3924A Zellen wurden verwendet, weil sie eine vergleichbare Sensitivität gegenüber den Benzamidkonjugaten zeigten wie B16 Melanomzellen und sie frei von Melanin sind. Die Methode zur Untersuchung des Einflusses von Melanin auf die Bioverfügbarkeit von Zytostatika wurde von Svensson et al. beschrieben, welche die Untersuchung mit Doxorubicin und Daunorubicin durchführten. [106] Die Diagramme 40 und 41 zeigen die Proliferationsrate von Morris Hepatoma Zellen in Anwesenheit zunehmender Mengen an Melanin. Das Benzamidzytostatikum und Melanin wurden separat zum selben Zeitpunkt zu den Zellen gegeben. Mit zunehmender Melaninmenge nahm die proliferationshemmende Wirkung der Verbindungen ab, was auf einen von der Melaninmenge abhängigen Abfangeffekt für diese Verbindungen schließen läßt. Es kommt zu einer Konkurrenz zwischen der Bindung der Substanz an Melanin und dem zytostatischen Effekt des ungebundenen Zytostatikums.

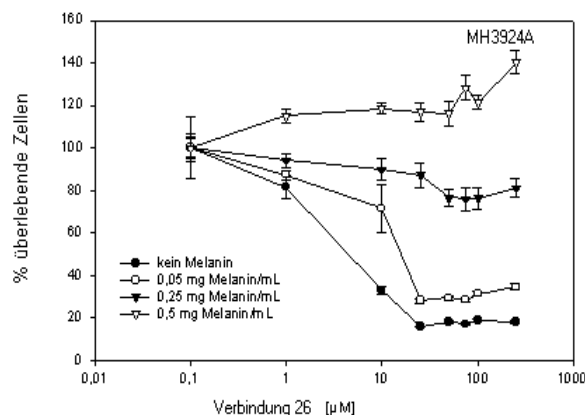
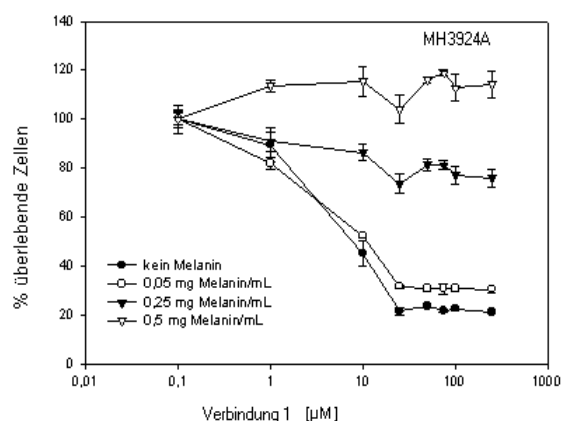
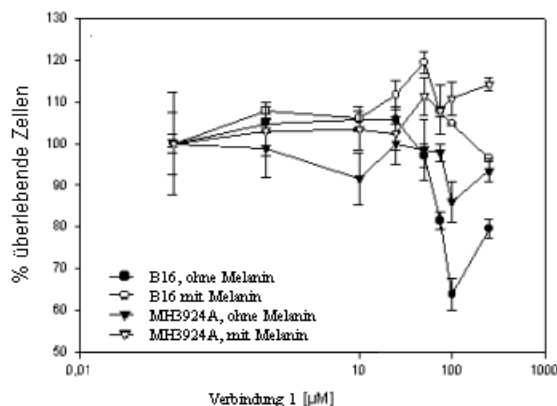
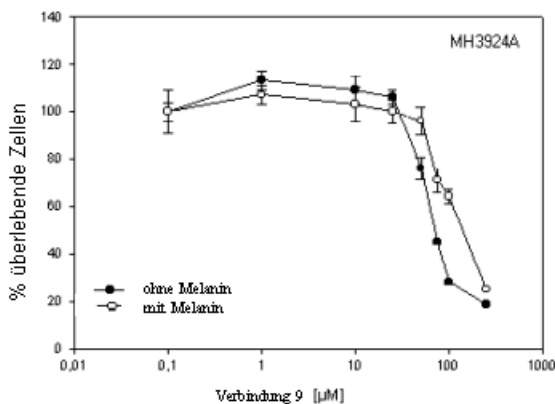
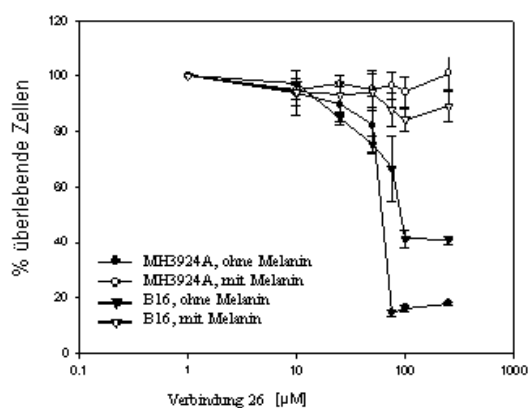
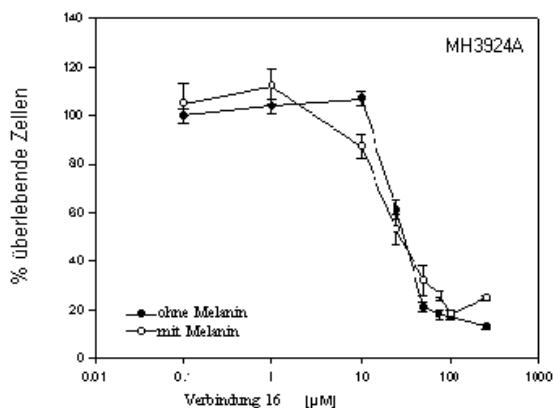


Diagramme 38 und 39: Einfluß von extrazellulärem, synthetischem Melanin auf die Zytotoxizität der Verbindungen **1** und **26**.

Das Experiment wurde aufgrund einer besseren experimentellen Handhabbarkeit wiederholt, indem Mischungen, bestehend aus 0,25 mg Melanin pro mL und verschiedenen Konzentrationen des Benzamidzytostatikums, eine Stunde lang präinkubiert wurden, bevor die sterilfiltrierten Zentrifugate dieser Mischungen zu den Zellen gegeben wurden. Das Benzamidderivat **1** hemmte die Proliferation in einem geringeren Umfang, wenn es mit Melanin präinkubiert wurde. Während der Präinkubation wurde ein Teil des Zytostatikums chemisch verändert, so dass die proliferationshemmende Wirkung geringer ausfiel als bei den Zytotoxizitätsuntersuchungen ohne Präinkubation. Auch bei Verbindung **9** zeigte sich, dass die Anwesenheit von Melanin während der Präinkubation zu einer Abnahme der Zytotoxizität führte. Die  $IC_{50}$  der in Abwesenheit von Melanin inkubierten Substanz lag bei 75 µM, bei der Anwesenheit von 0,25 mg/mL Melanin bei 210 µM. Melanin fängt demzufolge einen Teil des Benzamidzytostatikums ab.

Diagramme 40 und 41: Präinkubationsexperiment mit Verbindung **1** und **9**

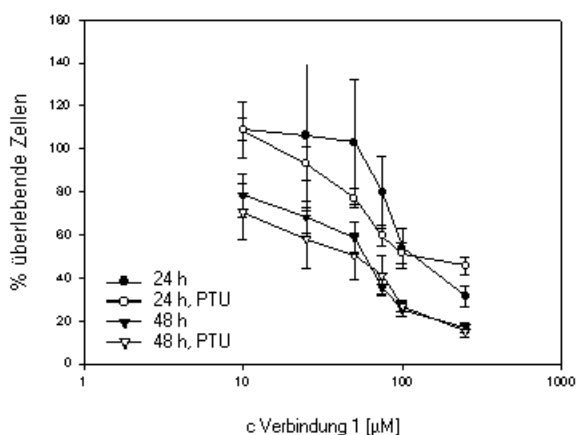
Bei Verbindung **16** wurde die  $IC_{50}$  erst bei einer doppelt so hohen Konzentration erreicht. Die  $IC_{50}$  lag bei der Präinkubation ohne Melanin bei 25  $\mu M$  (entspricht dem bei den Zytotoxizitätsuntersuchungen erhaltenen Wert), bei der Präinkubation mit 0,25 mg Melanin pro mL bei 50  $\mu M$ . Wurde Verbindung **26** mit Melanin präinkubiert, dann wurde die  $IC_{50}$  nicht erreicht. Es zeigte sich ein deutlicher Abfangeffekt durch das Melanin. War kein Melanin vorhanden, so zeigte sich der bereits bei den Zytotoxizitätsuntersuchungen gefundene zytostatische Effekt. Die  $IC_{50}$  lag bei diesem Experiment allerdings um 20-30  $\mu M$  über dem vorher gefundenen Wert, was mit der teilweisen Zersetzung der Verbindung während der Präinkubation erklärt werden kann.

Diagramme 42 und 43: Präinkubationsexperiment mit Verbindung **16** und **26**

Die Experimente, die den Einfluß von Melanin auf die Bioverfügbarkeit der Benzamidzytostatika untersuchten, belegen den Scavenger-Effekt von Melanin, der dazu führt, dass die Zytotoxizität der Benzamidzytostatika für B16 Melanomzellen geringer ist als für die anderen Krebszelllinien.

Um den Einfluß natürlichen Melanins auf die Zytotoxizität der Benzamidzytostatika zu untersuchen, wurden B16 Melanomzellen über mehrere Passagen hinweg mit PTU (Phenylisothioharnstoff) behandelt. PTU hemmt sowohl die Tyrosinhydroxylase-Aktivität als

auch die DOPA-Oxidase-Aktivität der Tyrosinase durch Komplexierung von  $\text{Cu}^{2+}$ . Die Kupferkationen sind als prosthetische Gruppe Teil des aktiven Zentrums der Tyrosinase.[107] Der Melaningehalt wurde spektralphotometrisch bei 405 nm bestimmt, um zu überprüfen, ob die PTU-Behandlung tatsächlich zu einer Abnahme des Melaningehaltes führte. Eine vollständige Hemmung aller Tyrosinasemoleküle ist nicht möglich. Wurden die mit PTU behandelten Zellen wieder ohne PTU kultiviert, so wurde wieder vermehrt Melanin synthetisiert. [108] Mit PTU



vorbehandelte B16 Melanomzellen waren kurze Zeit nach der Zugabe des Zytostatikums **1** sensitiver als normale B16 Melanomzellen. Insbesondere 24 Stunden nach der Inkubation mit dem Zytostatikum erkennt man, dass die Wirkung bei melaninärmeren Zellen stärker ist. Nach 72 Stunden ist kein Effekt mehr erkennbar. Dies lässt sich dadurch erklären, dass das Benzamidzytostatikum - wie später gezeigt - zu einem Anstieg des Melaningehaltes führt. Dieser Effekt macht sich erst zu einem späteren Zeitpunkt bemerkbar, nicht aber kurz nach der Inkubation der Zellen mit dem Zytostatikum. Ein Teil der PTU-Wirkung wird somit kompensiert. Die Tyrosinase besitzt bei pH = 6,8 ihr Optimum. Das Benzamidzytostatikum **1** führt zu einem Anstieg des intramelanosomalen pH-Wertes und sorgt dafür, dass die nicht inhibierten Tyrosinasemoleküle effektiver arbeiten.

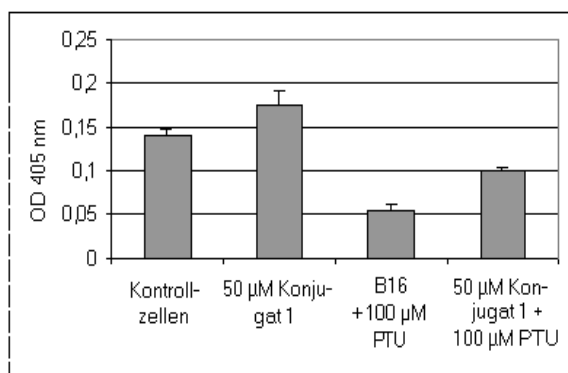


Diagramm 45: Einfluß von PTU und Einfluß des Benzamidzytostatikums **1** auf den Melaningehalt von B16 Melanomzellen.

Ein Teil der B16 Melanomzellen wurde über mehrere Passagen hinweg in Anwesenheit von PTU kultiviert. Der Melaningehalt der PTU behandelten Zellen und unbehandelten Zellen wurde bestimmt. Der Melaningehalt von PTU behandelten B16 Melanomzellen war geringer. Es zeigte sich, dass das Zytostatikum den Melaningehalt anhebt und zwar sowohl bei den PTU vorbehandelten B16 Melanomzellen als auch bei den normalen B16 Melanomzellen. Das Zytostatikum kann tatsächlich einen Teil der PTU Wirkung kompensieren.



Bei Verbindung **26** zeigte sich der Unterschied zwischen den unbehandelten B16 Melanomzellen und denjenigen, die mit PTU behandelt wurden, am deutlichsten. 24 Stunden nach Inkubation mit dem Bis-Triazen **26** war der Unterschied zwischen PTU behandelten B16 Melanomzellen und den Kontrollzellen am ausgeprägtesten. Nach 48 Stunden kam es zu einer Annäherung der Werte, wobei die mit PTU behandelten B16 Melanomzellen etwas sensibler waren als die normalen B16 Melanomzellen.

Die Wirkung von Verbindung **16** war stärker bei PTU behandelten B16 Melanomzellen, insbesondere bei 250  $\mu\text{M}$  wurde die größte Differenz festgestellt. Auf die Proliferationshemmung der Verbindung **9** war es bedeutungslos, ob die B16 Melanomzellen mit PTU vorbehandelt worden waren oder nicht.

Der Verlauf der Zytotoxizitätskurve ist bei PTU-vorbehandelten B16 Melanomzellen und normalen B16 Zellen für Verbindung **9** identisch. Die zytostatische Wirkung der Benzamiderivate war vom Melaningehalt der B16 Melanomzellen abhängig.

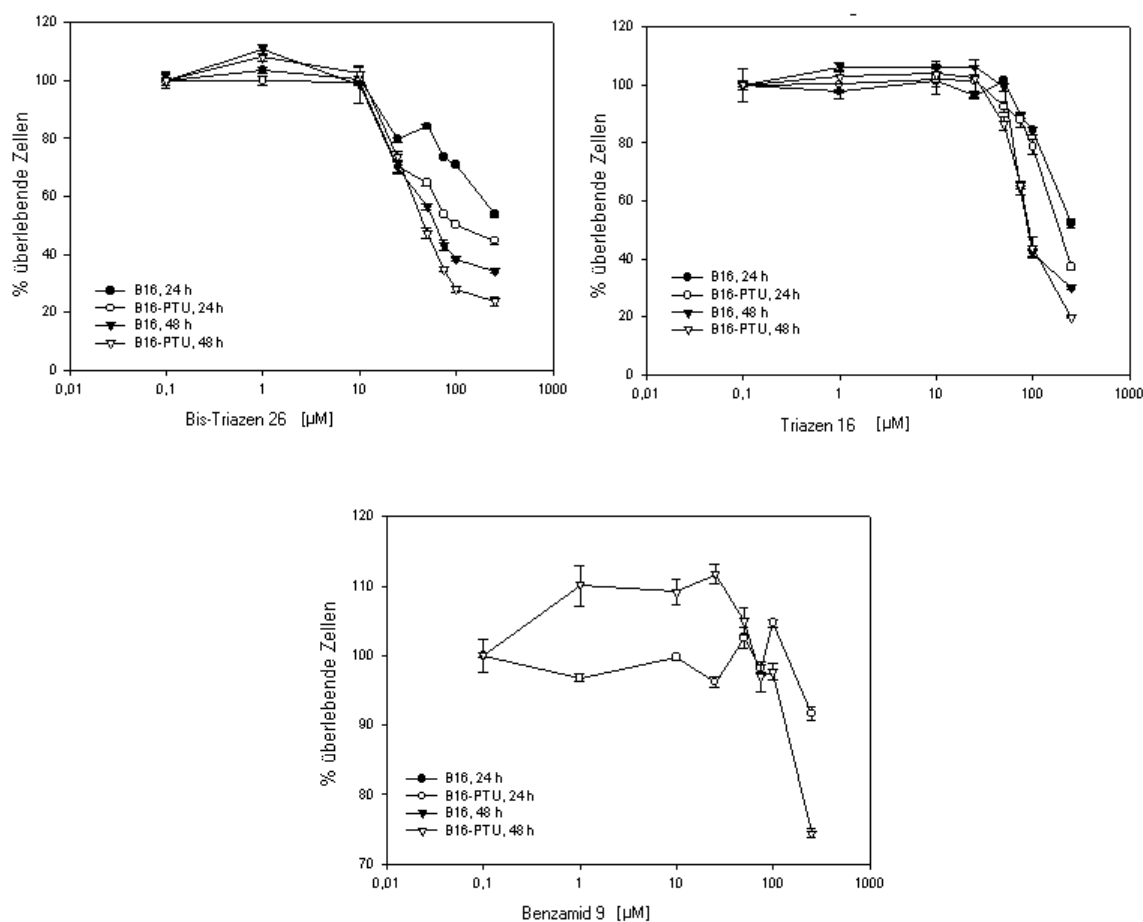
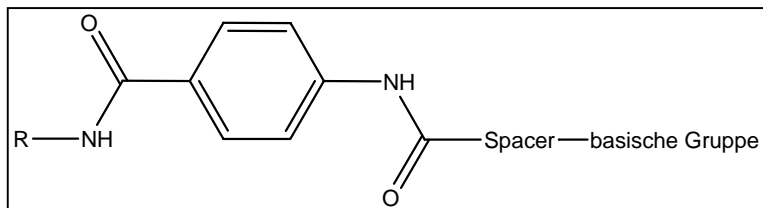


Diagramme 46-48: Einfluß von PTU auf die Zytotoxizität von **26**, **16** und **9**.

#### 4.4.4. Struktur-Wirkungs-Beziehung für DNS- und Melaninaffinität

Aus den Untersuchungen kann eine Struktur-Wirkungs-Beziehung für DNS- und Melanin-Liganden aufgestellt werden. Das Molekül muss mehrere Säureamidbindungen in einem gewissen Abstand voneinander aufweisen; der Abstand sollte 4 Atome betragen und diese 4 Atome sollten Bestandteil eines aromatischen Systems sein; und eine basische Endgruppe besitzen, die unter physiologischen Bedingungen protonierbar ist. Dann kann die Verbindung über Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Ion-Wechselwirkungen mit der DNS und mit Melanin wechselwirken.



Formelbild 32: Allgemeine Strukturformel für DNS- und Melaninliganden

Verbindungen mit hoher Melaninaffinität weisen auch eine erhöhte DNS-Affinität auf. Die Strukturelemente einer Verbindung, die eine erhöhte Melaninaffinität bedingen, bewirken auch eine stärkere Bindung einer Substanz an die DNS.

Die synthetisierten Benzamidzytostatika zeigen eine stärkere Wirkung als die ursprünglichen Zytostatika. Eine Melanomselektivität im strengen Sinne weisen sie jedoch nicht auf.

Die verbesserte Wirkung auf Melanomzellen kommt nicht durch die Anreicherung im Melanom zustande, sondern durch die erhöhte DNS-Affinität der Verbindungen im Vergleich zu Chlorambucil und Dacarbazin. Die Bindung an Melanin verhindert eher eine noch stärkere Wirkung, weil die Anreicherung der Benzamidzytostatika nicht am intrazellulären Wirkort, dem Zellkern, sondern in einem anderen Zellorganell angereichert wird.

Das Benzamidstrukturelement ist dennoch geeignet die zytostatische Aktivität zu verbessern, allerdings nur von Zytostatika, die mit der DNS interagieren.

Dennoch könnten die Verbindungen aufgrund der stärkeren Zytotoxizität eine Verbesserung der Therapie des metastasierenden malignen Melanoms bewirken.

#### 4.4.5. Beeinflussung des intramelanosomalen pH-Wertes durch Benzamidkonjugate und simultane Darstellung der Apoptoseinduktion durch Benzamidzytostatika mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie

Acridinorange wurde dazu herangezogen, um den Einfluß der Benzamidkonjugate mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie auf den intrazellulären pH-Wert von B16 Melanomzellen zu untersuchen. [109],[110] Die Wellenlänge des emittierten Fluoreszenzlichtes hängt vom pH-Wert ab. In saurem Milieu wird orangefarbenes Fluoreszenzlicht emittiert, in neutralem Milieu gelbes und in basischem Milieu grünes.[105] Acridinorange ist nicht nur ein Säure-Base-Indikator, sondern färbt auch DNS und RNS unterschiedlich --an. Einsträngige DNS und RNS fluoreszieren rot, doppelsträngige DNS fluoresziert dunkelgrün, nachdem Acridinorange mit ihnen interagiert. [109], [110]

Zytostatika können zur Induktion der Apoptose führen. [111] Apoptotische Zellen weisen gegenüber nicht-apoptotischen Zellen morphologische Veränderungen auf, die mittels Fluoreszenzmikroskopie nach Inkubation der Zellen mit Acridinorange (dient nur der Anfärbung, erzeugt keine Apoptose) visualisierbar sind. [112] Die Endonuklease-vermittelte Fragmentierung der DNS mit zunehmender Bildung einsträngig vorliegender DNS und eine Zellkernfragmentierung treten im Lauf der Apoptose auf. [113]

Die Fotos 5 b und 5 d zeigen die Überlagerung zweier Phänomene, welche die Benzamidzytostatika hervorrufen. Zum einen erhöhen die den intramelanosomalen pH-Wert, zum anderen induzieren sie Apoptose in den Zellen als Folge ihrer zytostatischen Wirkung.

B16 Melanomzellen, die nicht mit einem Benzamidkonjugat inkubiert wurden, zeigten orangefarbene Punkte und ein grün gefärbtes Zytosol (Abbildung 5 a). Stark saure Zellorganellen fluoreszieren orange, Organellen mit schwach saurem pH-Wert gelblich und basische und neutrale grün. Die Melanosomen gehören zu den sauren Zellorganellen. Daneben erkennt man die grün fluoreszierenden Nukleoli. Nach einstündiger Inkubation der B-16 Melanomzellen mit einer 50  $\mu$ M Lösung des Triazens **16** war in den dendritischen Strukturen der B16-Melanomzellen eine Abnahme der orange fluoreszierenden Punkte zu erkennen, bei gleichzeitiger Zunahme gelb fluoreszierender Punkte (Abbildung 5 c). Dies bedeutet, dass der intramelanosomale pH-Wert durch das Benzamidzytostatikum angehoben wurde. Dieses Benzamidzytostatikum zeigte von den drei hier exemplarisch untersuchten Benzamidzytostatika die geringste zytotoxische Wirkung bei der Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte mittels MTS-Assay und eine erst spät einsetzende Wirkung. Eine Veränderung der Zellmorphologie war nicht erkennbar.

50  $\mu$ M des Bis-Triazens **26** führten nach einer Stunde zu einer Anhebung des intramelanosomalen pH-Wertes und zum anderen zur Apoptoseinduktion. Alle Zellkerne zeigten eine durch dieses Benzamidzytostatikum hervorgerufene, starke morphologische Veränderung, dessen  $IC_{50}$  bei 50  $\mu$ M liegt und damit am niedrigsten in Bezug auf die beiden anderen fluoreszenzmikroskopisch untersuchten Benzamidzytostatika. Während der Apoptose wird die Zellkernmembran durchlässiger, durch die dann einsträngige DNS-Fragmente in das Zytosol gelangen. Diese Fragmente waren bei den konfokalen Aufnahmen deutlich erkennbar (rote Fluoreszenz). Das Benzamidzytostatikum mit der größten Toxizität zeigte die stärksten Veränderungen im Zellkern, während das mit der geringsten kaum eine Veränderung zeigte.

Eine 50  $\mu$ M Lösung Verbindung **1** verursachte ebenfalls einen intramelanosomalen pH-Wert-Anstieg und darüberhinaus auch Apoptose, aber zu einem geringeren Ausmaß als Verbindung **26**.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Effekte der Zytostatika.

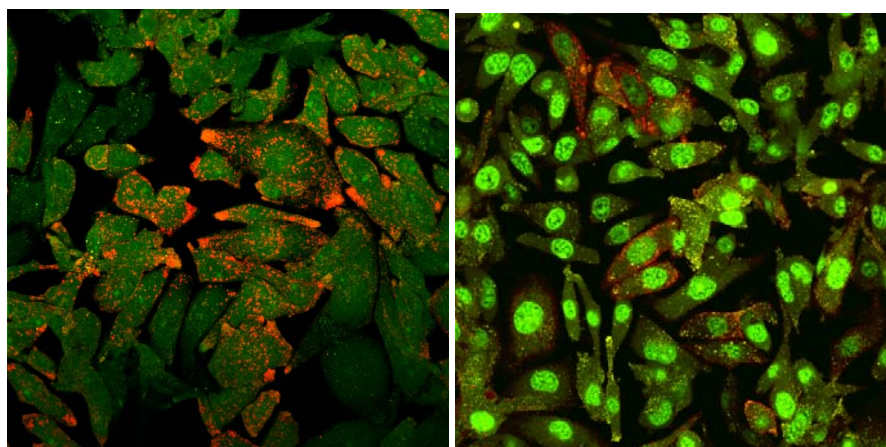


Abb. 5 a

Abb. 5 b

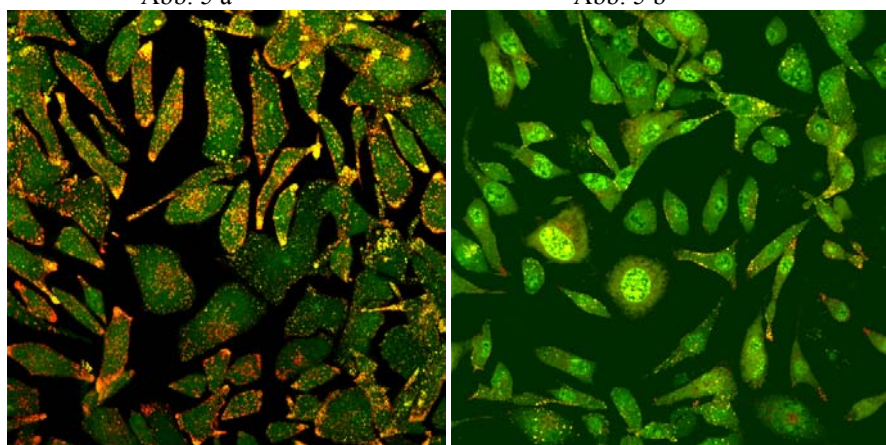


Abb. 5 c

Abb. 5 d

Abb. 5 a: B16 Melanomzellen, 1 Stunde ohne Zusätze im Brutschrank stehen lassen, danach 30 Minuten lang mit Acridinorange behandelt. Nucleoli grün, Melanosomen in den dendritischen Strukturen orange.

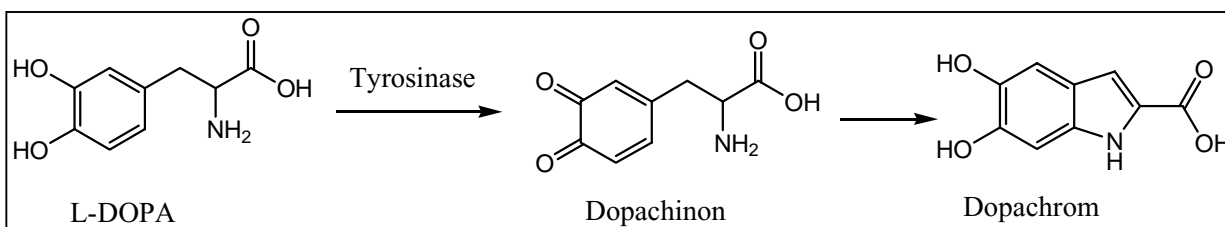
Abb. 5 b: B16 Melanomzellen, 1 Stunde lang mit Verbindung **1** inkubiert, danach 30 Minuten mit Acridinorange inkubiert. Neben dem intramelanosomalen pH-Anstieg erkennt man frühapoptotische Prozesse.

Abb. 5 c: B16 Melanomzellen, 1 Stunde lang mit Verbindung **16** inkubiert, danach 30 Minuten mit Acridinorange inkubiert. Der pH-Anstieg in den Melanosomen ist erkennbar an der emittierten gelben Fluoreszenz.

Abb. 5 d: B16 Melanomzellen, 1 Stunde lang mit Verbindung **26** inkubiert, danach 30 Minuten mit Acridinorange inkubiert. Hauptsächlich apoptotische Prozesse erkennbar. Bei den roten Strukturen handelt es sich um ssDNS.

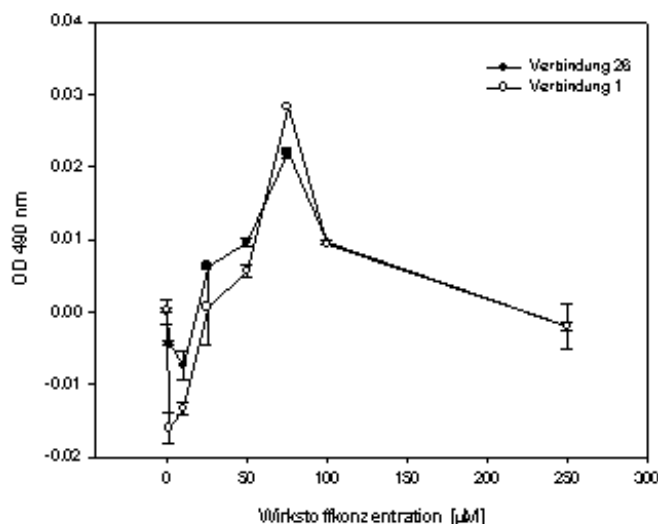
#### 4.4.6. Beeinflussung des Melaningehaltes und der Tyrosinaseaktivität durch Benzamidkonjugate

Das pH-Optimum der Tyrosinase liegt bei pH = 6,8. Die Neutralisation des intramelanosomalen pH-Wertes bedeutet, dass es zu einer Erhöhung der Tyrosinaseaktivität kommt. Da die Benzamidkonjugate den intramelanosomalen pH-Wert anheben, sollten sie auch die Tyrosinaseaktivität und den Melaningehalt erhöhen. Daher wurden B16 Melanomzellen mit einem Benzamidzytostatikum inkubiert und nachfolgend die Tyrosinaseaktivität und der Melaningehalt bestimmt. Nach einer 24stündigen Inkubationszeit wurde eine 10 nM Lösung von L-DOPA zu den Zellen gegeben und die optische Dichte bei 490 nm bestimmt. L-DOPA wird zu Dopachinon oxidiert, das dann weiter zu Dopachrom, dessen Absorptionsmaximum bei 475 nm liegt, reagiert. Der Tyrosinaseaktivitätsassay beruht auf der Messung des Dopachromgehaltes.[114] Kurz nach Zugabe von L-DOPA kommt es zu einem Anstieg der OD, bedingt durch die Zunahme an Dopachinon. Danach nimmt die optische Dichte wieder ab, bis sie sie innerhalb von 5 Stunden nach der Zugabe von L-DOPA stark zunimmt. [115]



Reaktionsschema 20: Funktionsprinzip des Tyrosinaseaktivitätsassays.

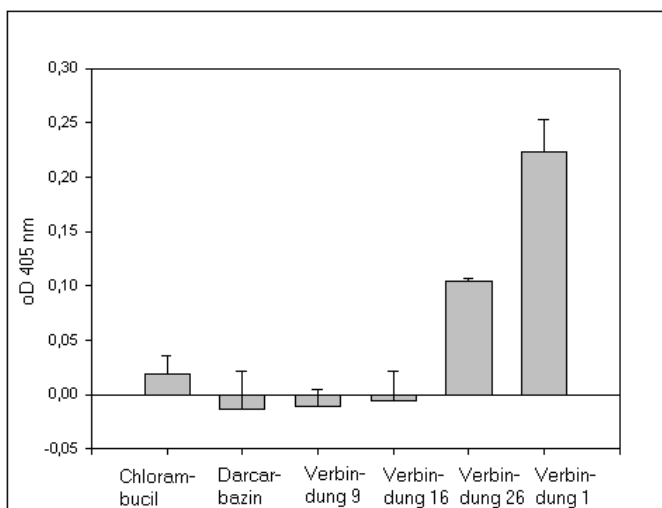
Chlorambucil und Dacarbazin induzierten keinen Anstieg der Tyrosinaseaktivität. Dahingegen führten die Benzamide **1** und **26** zu einem Anstieg der Tyrosinaseaktivität bei 75  $\mu\text{M}$ , wobei Verbindung **26** einen etwas stärkeren Anstieg der Enzymaktivität bewirkte. Die Benzamide **9** und **16** führten nicht zu einem Anstieg der Tyrosinaseaktivität.



Auch in der Kontrolle, die keine Benzamid enthielt, kam es zur Bildung von Dopachrom, allerdings in einem viel geringeren Maß als bei der vorherigen Inkubation der Zellen mit dem Benzamid.

Diagramm 49: Einfluß der Benzamide **1** und **26** auf die Tyrosinaseaktivität. Die Kontrolle wurde auf 0 gesetzt.

Der direkte Nachweis der Annahme, dass Benzamidkonjugate die Melaninsynthese induzieren können, wurde durch die Bestimmung des Melaningehaltes von B16 Melanomzellen erbracht. Die Zellen wurden 1 Stunde lang mit einer 50  $\mu$ M Lösung des jeweiligen Konjugates inkubiert. 24 Stunden später wurde die gebildete Menge an Melanin bestimmt. Bis-Triazen **26** führt zu



einem 1,5fach höheren Wert des Melaningehaltes im Vergleich zur Kontrolle, das Chlorambucilkonjugat **1** sogar zu einem dreifach höheren Wert. Die anderen getesteten Verbindungen (**16**, **9**, Chlorambucil und Dacarbazin) führten bei dieser Konzentration nicht zur Induktion der Melaninsynthese. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen, die bei der Untersuchung des Einflusses der Benzamidkonjugate auf den intramelanosomalen pH-Wert und der Tyrosinaseaktivität erhalten wurden.

Diagramm 50: Melaningehalt von B16-Melanomzellen nach Inkubation mit verschiedenen Zytostatika. Die OD der Kontrollzellen wurde auf 0 gesetzt. Die Balken zeigen die zusätzlich produzierte Melaninmenge oder die verminderte Melaninmenge im Vergleich zur Kontrolle.

#### 4.4.7. Anreicherungsmechanismus und Schlussfolgerungen

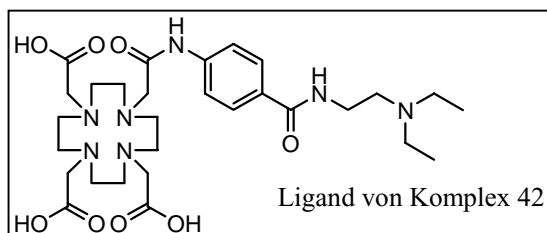
Es wurde gezeigt, dass das getestete Chlorambucilkonjugat und das Chlorambucilanalogon eine höhere DNS-Affinität aufweisen als Chlorambucil. Die Zytostatika mit einer Triazenfunktion im Molekül wurden zu einem größeren Ausmaß an die DNS gebunden als die anderen Zytostatika, wobei die Triazen-Benzamide stärker an DNS gebunden wurden als Dacarbazin. Die  $IC_{50}$ -Werte für B16 Melanomzellen korrelieren mit der Melaninaffinität der Benzamid-Zytostatika. Je höher die Melaninaffinität ist, desto geringer ist die zytostatische Wirkung. Die Benzamidzytostatika heben den intramelanosomalen pH-Wert an, was zu einer Erhöhung der Tyrosinaseaktivität und damit auch des Melaningehaltes führt. Die Folge dieser Reaktionskette ist die Verstärkung des Abfangeffektes für Benzamid-Zytostatika. Es bedarf daher weiterer Modifikationen des Trägermoleküls, um den Targetingeffect zu verbessern.

## 4.5. Zellaufnahmestudien der Gadoliniumkomplexe

Die intrazelluläre Konzentration der Gadoliniumkomplexe wurde bestimmt, um festzustellen, ob sie sich in Melanomzellen anreichern, und ob sie sich dort zu einem größeren Maß anreichern als in anderen Zelllinien. B16 Melanomzellen wurden 24 Stunden lang mit verschiedenen Konzentrationen der Gadoliniumkomplexe inkubiert. Bei verhältnismäßig gut internalisierten Komplexen wurde zusätzlich die von MH3924A aufgenommene Menge bestimmt.

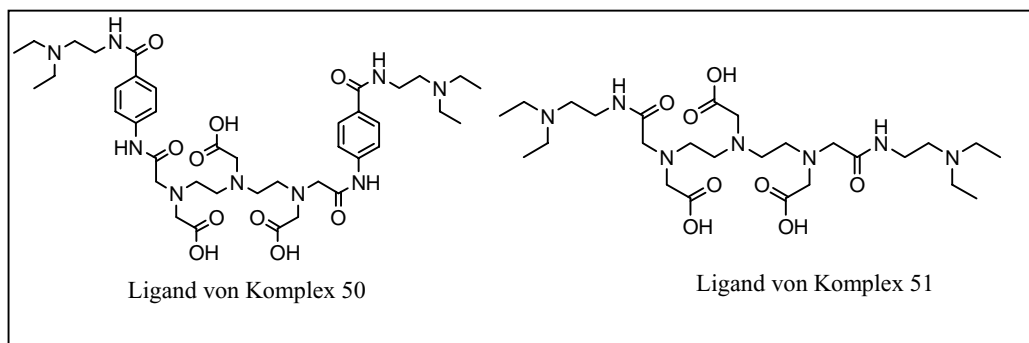
Der intrazelluläre Gadoliniumgehalt wurde mittels ICP-MS bestimmt. Als Kontrollen dienten Gd-DOTA und Gd-DTPA. Die von den B16 Melanomzellen aufgenommene Menge dieser Kontrollkomplexe lag unter der Nachweisgrenze

Durch die Konjugation von Benzamiden an die Chelatoren DOTA und DTPA wurde mehr



DOTA-Benzamid-Konjugat

Gadolinium in die Zellen geschleppt, insgesamt gesehen aber nur geringe Mengen. Dabei zeigte sich, dass die Konjugation von Benzamiden an DOTA eine bessere Aufnahme in die Zellen bewirkt als die Verknüpfung mit DTPA.



DTPA-Benzamid-Konjugate

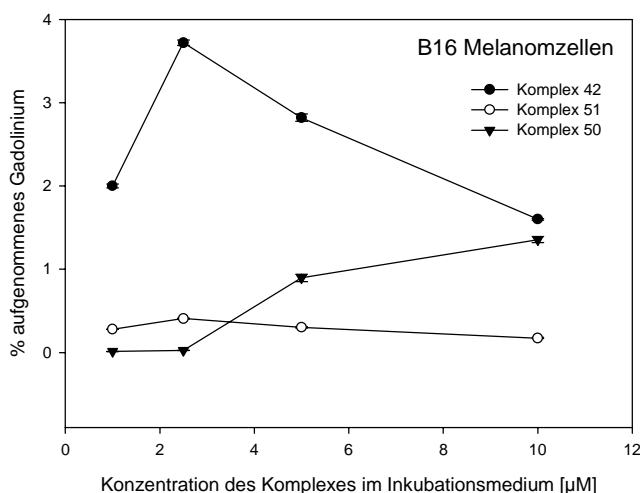
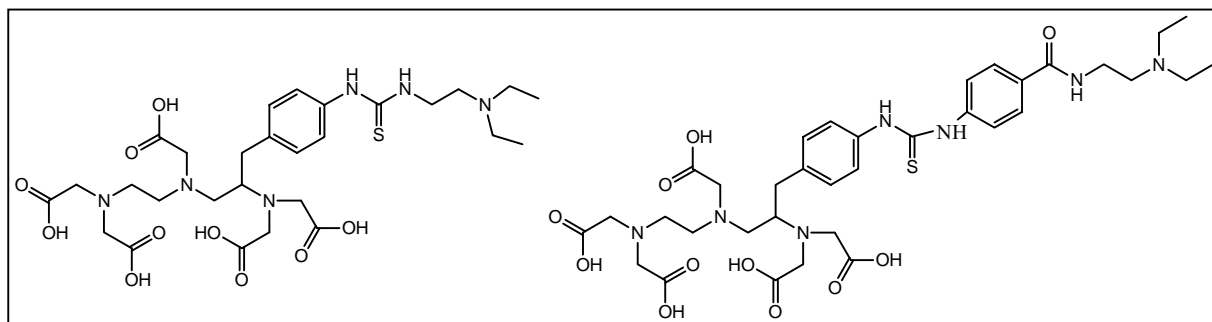


Diagramme 51: Aufnahme der Gadoliniumkomplexe 50, 51 und 42 in B16 Melanomzellen.

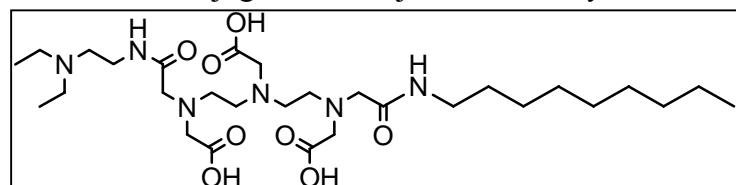
Zwei weitere DTPA-Benzamidkonjugate wurden nicht getestet, weil ihre physiokochemischen Eigenschaften noch ungünstiger waren als die der Verbindungen **50** und **51**. Somit wäre eine noch schlechtere Aufnahme zu erwarten gewesen.



Strukturformel der weiteren DTPA-Konjugate

Benzamide führen nur zu einer geringen Verbesserung der Internalisierung von Stoffen in die Zelle. Es wurde daher notwendig, Strategien zu entwickeln, die eine Verbesserung der Aufnahme in die Zelle bewirken könnten.

Durch die Konjugation von je einem Nonylamin und einem Benzamid an DTPA sollte ein lipophilerer Komplex erhalten werden.



Die Hoffnung bestand darin, dass eine Erhöhung der Lipophilie auch eine bessere Aufnahme in die Zellen bewirkt. Die ICP-MS-Messungen zeigten jedoch, dass die

aufgenommene Menge an  $Gd^{3+}$  unterhalb der Nachweisgrenze lag. Die Erhöhung der Lipophilie reichte nicht aus, um die Internalisierung der Chelatoren zu bewerkstelligen.

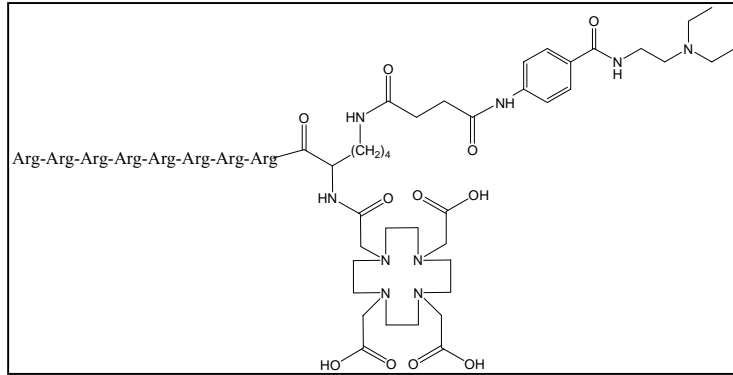
Zellen sind in der Lage, durch rezeptorvermittelte Endozytose oder durch Carrier (= Transportproteine in der Zellmembran), Stoffe in die Zelle aufzunehmen, die durch passive Diffusion die Zellmembran nicht überwinden könnten.

Peptide, die zu einem hohen Prozentsatz kationische Aminosäuren enthalten, haben die Fähigkeit die Plasmamembran zu durchdringen. Daher wurden sie benutzt, um den Transport nicht membrangängiger Substanzen zu verbessern. Besonders gut als Schlepper geeignet sind Polyarginine, wobei die Guanidgruppe verantwortlich für die Aufnahme in die Zelle ist. [116]

Suzuki et al. zeigten, dass Octaarginin (Arg(8)), effektiv die Zellmembran durchqueren konnte. Endozytoseinhibitoren und auch Stoffe, die aktive Transportprozesse hemmen, hatten keinen Einfluß auf die Aufnahme von Octaarginin. Der genaue Aufnahmemechanismus ist noch unbekannt [117] Aus diesem Grund wurde Octaarginin als Schlepper für die Komplexe gewählt. Weil DOTA-Procaïnamid besser aufgenommen wurde als die DTPA-Komplexe, wurde DOTA als Chelator gewählt.

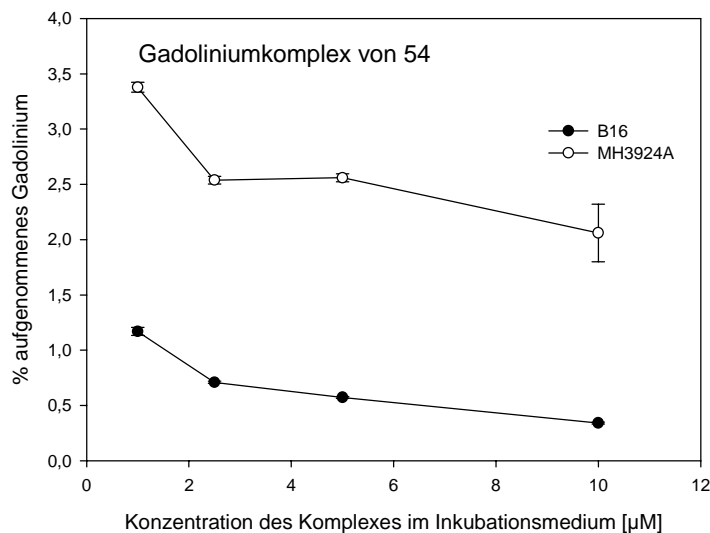
Der Chelatligand **53** stellt ein Konjugat aus DOTA, Procaïnamid und Octa-Arginin dar. Die von B16 Melanomzellen internalisierte Menge dieses Komplexes war geringer als die von DOTA-Procaïnamid. Allerdings wiesen MH3924A Zellen eine höhere Aufnahme des Komplexes auf.



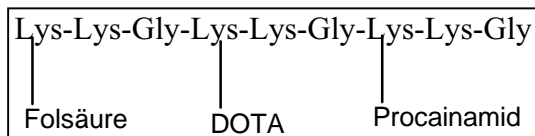
Chelatligand des Gadoliniumkomplexes **54**

Durch die zusätzliche Verknüpfung mit Octaarginin konnte weder eine bessere Aufnahme des Komplexes in B16 Melanomzellen erzielt werden, noch war dieser Komplex melanomspezifisch.

Das Diagramm 54 visualisiert die Ergebnisse der Zellaufnahmestudie mit dem Komplex von **54**.

Diagramm 52: Aufnahme des Gadoliniumkomplexes von **54**

aufgenommen wird. [119]



Die in die Zellen geschleppte Menge an Gadolinium war gering, wobei in MH3924A eine fünffach größere Menge internalisiert wurde. Nur Zellen, die den hfR-Rezeptor tragen, internalisieren Folsäurekonjugate effektiv. Beide Testzelllinien scheinen wohl nur sehr geringe Mengen dieses Rezeptors zu exprimieren. Auch mit Folsäure als Trägermolekül ließ sich das Ziel, ein melanomspezifisches MRT-Kontrastmittel zu erhalten, nicht verwirklichen.

Ein weiteres Schleppermolekül stellt die Folsäure dar, die durch rezeptorvermittelte Endozytose

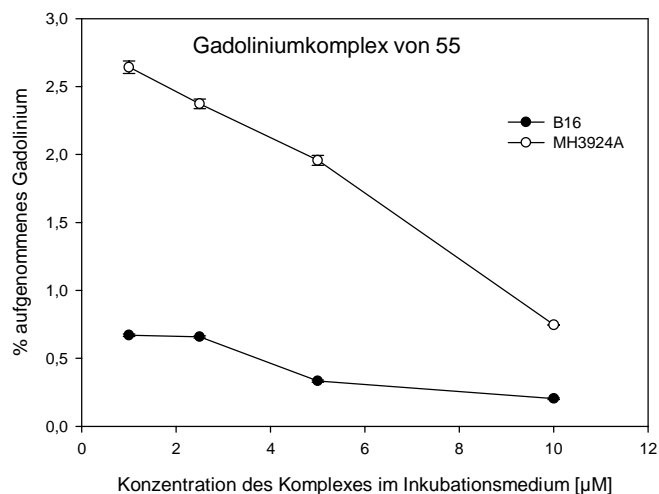
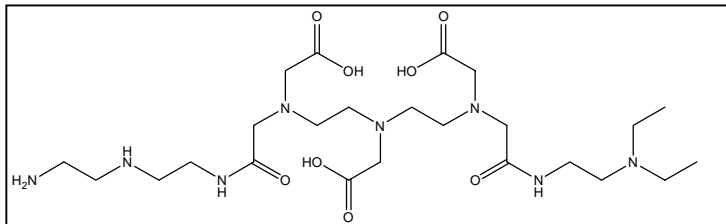


Diagramm 53: Aufnahme des Gadoliniumkomplexes von **55**

Polyamine werden carriervermittelt (Transportprotein in der Zellmembran) in die Zelle transportiert. [118] Durch die Konjugation von DTPA an ein Polyamin und Diethylaminoethylamin konnte die Aufnahme des Chelators in die Zelle verbessert werden. Bezogen auf die anderen DTPA-Komplexe wurde 10mal mehr aufgenommen und bezogen auf Gd-DOTA-Procainamid die fünffache Menge.



Da das Polyaminkonjugat mit einer Aufnahme von 10% die bisher vielversprechendste Verbindung war, wurden auch mit einer anderen Zelllinie Versuche zur Zellaufnahme durchgeführt. Allerdings konnten MH3924A Zellen den Komplex

besser internalisieren, wobei bis zu 45% aufgenommen wurden.

Es wurden zwei weitere Polyamine synthetisiert, die jedoch nicht getestet werden konnten, weil die entsprechenden Gadoliniumkomplexe in keinem Lösungsmittel löslich waren.

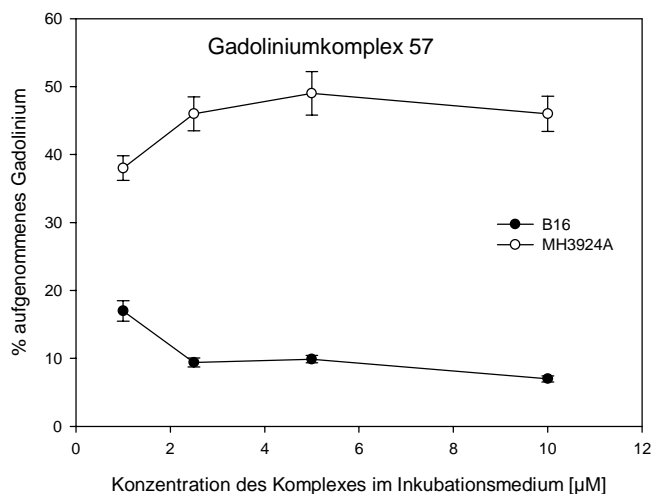


Diagramme 54: Zellaufnahmestudien des Polyaminkomplexes **57**.

Außerdem wurde der Versuch unternommen, Gadoliniumkationen mit Hilfe eines Dithiocarbamates in die Zellen zu schleppen. Am besten aufgenommen wurde der Gadoliniumkomplex von MH3924A, gefolgt von HeLa. B16 Melanomzellen zeigten die geringste Aufnahme.

Auch dieser Gadoliniumkomplex mit einem Benzamidstrukturelement war nicht melanomspezifisch. Die Aufnahme der Gadoliniumkomplexe in die Zelle war, von den Polyaminkonjugaten abgesehen, gering. Alle synthetisierten Komplexe wurden von der Vergleichszelllinie besser internalisiert als von den Zielzellen.

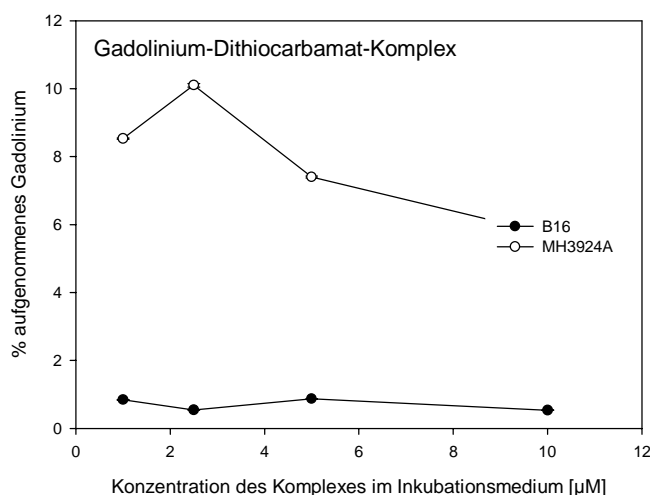
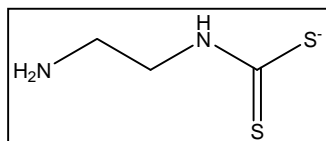


Diagramm 55: Aufnahme von Gadolinium-Dithiocarbamat in B16 und MH3924A.

Die Aufnahme der getesteten Gadoliniumkomplexe in die Vergleichszelllinie war größer als in B16 Melanomzellen. Aus den Ergebnissen der Zellaufnahmestudien geht hervor, dass mit Hilfe der Benzamide keine melanomspezifischen MRT-Kontrastmittel erhalten werden können. Der

Grund dafür liegt in den physikochemischen Eigenschaften der Komplexe. Um melanomspezifische MRT-Kontrastmittel zu erhalten, wäre eine Anreicherung der Komplexe im Melanosom erforderlich.

## 5. Experimenteller Teil

### 5.1. Materialien und Methoden

Alle kommerziell erhältlichen Chemikalien (Liste 1 zeigt die verwendeten Chemikalien und nennt die Bezugsquellen) wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. [<sup>131</sup>I]Iodid mit einer spezifischen Aktivität von 90 GBq/μmol in 0.02 M NaOH wurde von Amersham Int. (England) erhalten. Schmelzpunkte (Mp) wurden in offenen Glaskapillaren mittels einer elektrothermischen Apparatur bestimmt und sind unkorrigiert. HPLC wurde mit einem Kontron 450 System durchgeführt, das mit einem variablen UV Detektor ausgestattet war. Die Rp<sub>18</sub>-HPLC-Säule war eine Nucleosil C<sub>18</sub> 100 A (Größe 250 × 4.6 mm, 5 μ; Phenomenex, Aschaffenburg). Präparative Säule: Lichrocart 250-10, Pr18 select B 10 μm, Lichrosorb (Merck, Darmstadt).

Die Lösungsmittel, die bei den HPLC-Läufen Verwendung fanden, setzten sich aus MeOH und 0.9% TRIS Puffer, dessen pH-Wert mittels H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf 2.6 eingestellt wurde. Außerdem wurde Acetonitril mit 0,1% TFA und Aqua bidest. mit 0,1% TFA verwendet. Zusätzlich diente auch Acetonitril/Wasser 80:20 (Fließmittel B) und 0,1% HCl in Wasser (Fließmittel A) als Fließmittelgemisch. Die Charakterisierung der synthetisierten Substanzen erfolgte mittels folgender analytischer Methoden: ESI-MS (TSQ 7000, Finnigan, San Jose, USA); MALDI-TOF Massenspektrometer (MALDI III, Kratos/Shimadzu, Duisburg); Elementaranalyse (Mikroanalytisches Labor, Fakultät für Chemie und Geologie, Universität Heidelberg); <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie mit 7.0 T (Bruker AM-300 Spektrometer, Rheinstetten, Deutschland).

#### Liste 1:

Von Sigma -Aldrich (Deutschland) wurden bezogen:

Chlorambucil, HATU, Procainamidhydrochlorid, Diethylaminoethylamin, TFA, 2-Pyrrolidin-1-yl-ethylamin, Morpholino-1-yl-ethylamin, Piperidino-1-yl-ethylamin, 4-Aminobenzoessäureethylester, Ethylenoxid, POCl<sub>3</sub>, *N*-(2-Hydroxyethyl)-piperazin, *N,N*-[Bis-(2-Hydroxyethyl)]-ethylendiamin, Thionylchlorid, Metoclopramid, Benzoylchlorid, Methoxybenzoessäure, Natriumnitrit, Dimethylamin, Diethylamin, Piperidin, Piperazin, 4-Aminobenzoessäure, 4-Amino-5-chlor-2-methoxy-benzoessäure, 9,10-Dioxo-9,10-Dihydroanthracen-2-carbonsäure, Methotrexat, DCC, Schwefelkohlenstoff, CuCl<sub>2</sub>, 3,4-Diaminobenzoessäure, Boc-Anhydrid, 2,3-Diaminopropionsäurehydrochlorid, KHSO<sub>4</sub>, 2-Oxazolidinon, 2-(2-Methoxyethoxy)ethanol, Triisopropylamin, Gadolinium(III)acetat, 4-Hydroxyphenylethylsäure, EDTA-dianhydrid, DTPA-dianhydrid, EDTA, Schwefelwasserstoff, Nonylamin, 5-Cholesten-3β-[*N*-phenyl]-amin, Bernsteinsäureanhydrid, EDC, Folsäure, Spermidin, CDI, tert. Butanol, Bis-(2-aminoethyl)amin, *N*-Acetylprocainamid, Ethidiumbromid, synthetisches Melanin, Thymuskälber-DNS, Acridinorange, L-DOPA, HNO<sub>3</sub> Trace Select.

Merck (Darmstadt, Deutschland): Kaliumtetrachloroplatinat (II), HBTU, (Fmoc)Gly, Fmoc-(Dde)-Lys, Fmoc-(Boc)-Lys, Fmoc-(Pcm)-Arg.

Macrocyclics (USA): DOTA-tris(tert. butylester), Cyclen, Para-Isothiocyanatobenzyl-diethylentriaminpentaessigsäure.

### 5.1.1. Bestimmung des Gadoliniumgehaltes in biologischen Proben

#### 5.1.1.1. Hochdruckmikrowellenaufschluß [120]

Der Analyt muss durch ein Aufschlußverfahren vor der eigentlichen Gehaltsbestimmung mittels ICP-MS in eine wäßrige Lösung überführt werden. Durch den Aufschluß sollen die organischen Verbindungen aus dem Analyten entfernt werden, da diese zu einer schlechten Zerstäubbarkeit der Probe führen und zusätzlich die Peaks des eigentlich zu bestimmenden Elementes überdecken können. Vor allem tierische Proben enthalten größere Mengen an Lipiden, deren vollständige Zersetzung nur schwer zu realisieren ist. Kohlenhydrate lassen sich am leichtesten entfernen. Proteine sind schwerer zu eliminieren, aber am diffizilsten ist es mit den Lipiden. Daher benötigt man stark oxidierende Bedingungen, um eine möglichst vollständige Entfernung der Matrix zu erreichen. Am besten geeignet ist der mikrowellengestützte Hochdruckaufschluß, weil bei Atmosphärendruck das Oxidationspotential der verwendeten oxidierenden Säuren durch die Siedetemperatur der Säure begrenzt ist. Die Quantifizierung des Gadoliniumgehaltes der aufgearbeiteten Probe erfolgt mittels ICP-MS.

#### 5.1.1.2. Hochauflösende ICP-Massenspektrometrie [120]

Mit einem ICP-MS-gerät wird eine zuvor in Lösung gebrachte Probe über einen Inertgasstrom in ein sogenanntes "induktiv gekoppeltes Plasma" (ICP) überführt. Das ist eine bis zu 10000 K heiße Flamme, die genug Energie liefert, um jedes Atom zu beinahe 100% zu ionisieren, und es dadurch der quantitativen analytischen Erfassung in einem Massenspektrometer zugänglich zu machen. Die Probenlösung wird in Form feinsten Tröpfchen in das Plasma gesprüht. Die HR-ICP-MS (high resolution inductively coupled plasma) findet Anwendungen in der Spuren- und Ultraspurenanalytik. Die übliche Art der Analyse mit HR-ICP-MS ist die Probeneinführung in gelöster Form nach vorhergehendem nasschemischem Aufschluß.

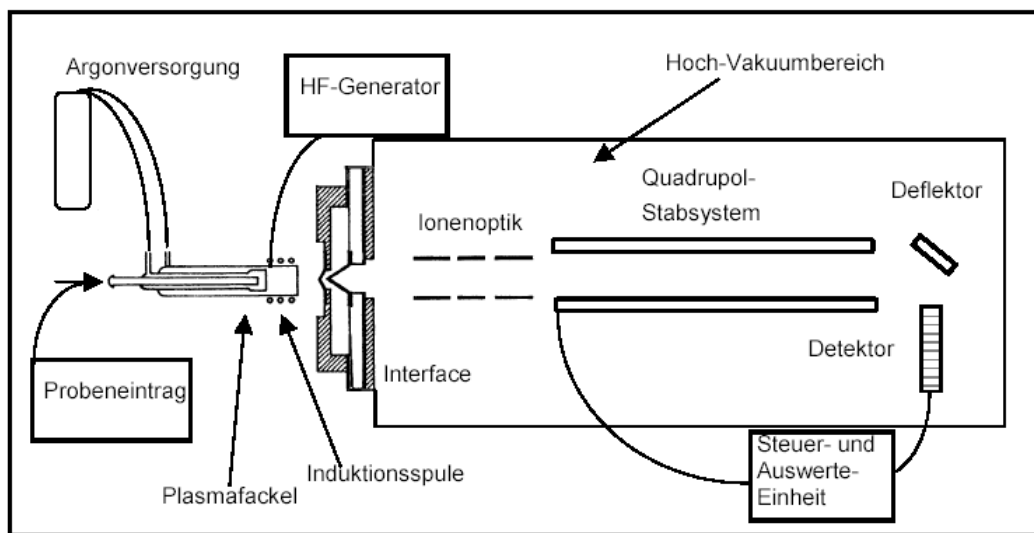


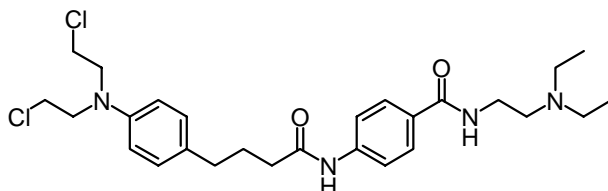
Abb 5: Schematischer Aufbau eines ICP-Massenspektrometers [121]

## 5.2. Chemische Synthesen

### 5.2.1. Benzamidzytostatika

#### 5.2.1.1. Chlorambucilkonjugate

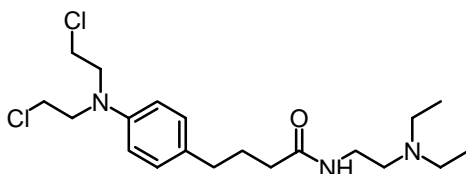
##### (4-{4-[Bis(2-chlorethyl)amino]phenyl}butanamido)-*N*-[2-(diethylamino)ethyl]-benzamid (1)



304 mg (1 mmol) Chlorambucil wurden in 4 mL CH<sub>3</sub>CN gelöst und anschließend mit 380 mg (1 mmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphat (HATU), gefolgt von einer Lösung von 236 mg (1 mmol) Procainamid in einem mL CH<sub>3</sub>CN, versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde lang bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Lösungsmittel am Ölpumpenvakuum abgezogen worden war, erfolgte die säulenchromatografische Aufreinigung auf Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH:Et<sub>3</sub>N (80:18:2) als Lösungsmittelgemisch. Aus den Fraktionen, die nur das Produkt enthielten, erfolgte die Kristallisation mit einer Mischung von Dichlormethan und Petrolether im Verhältnis 1:1. Die Umkristallisation aus Dichlormethan/Hexan (1:1) ergab 57 mg des Produktes (11 %).

Mp. 133 °C. ESI-MS: *m/z* 521,1 (M+H)<sup>+</sup>. Anal. (C<sub>27</sub>H<sub>38</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) berechnet: C, H, N: 62.18, 7.34, 10.74; gefunden: 62.05, 7.55, 10.69. <sup>1</sup>H-NMR (δ, CDCl<sub>3</sub>): 1,043 (t, 6 H); 2,652 (q, 4 H); 2,652 (t, 2H); 3,475 (q, 2 H); 7,356 (s, 1 H); 7,728 (d, 2H); 7,561 (d, 2 H); 6,953 (s, 1 H); 2,368 (t, 2 H); 2,024 (q, 2 H); 2,619 (t, 2 H); 7,066 (d, 2 H); 6,637 (d, 2H); 3,607 (m, 4 H); 3,671 (m, 4 H). <sup>13</sup>C-NMR (δ, CDCl<sub>3</sub>): 11,938; 26,921; 33,922; 36,851; 37,246; 40,523; 46,817; 51,390; 53,596; 112,263; 112,283; 119,075; 127,933; 129,724; 130,351; 140,695; 144,472; 166,632; 171,632.

##### 4-{4-(Bis[2-chlorethyl]amino)phenyl}-*N*-[2-(diethylamino)ethyl]butanamid (2)



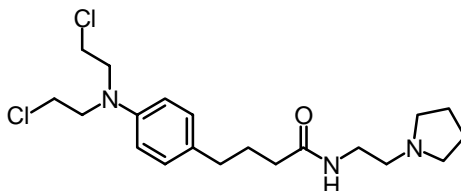
Analog der Synthese von Verbindung 1 wurde Chorambucil mit 116 mg (1 mmol) Diethylaminoethylamin konjugiert. Die Aufreinigung erfolgte wie bei Verbindung 1. Versuche, die Verbindung zu kristallisieren, blieben erfolglos. Allerdings konnte das Öl durch die Verwendung von Dichlormethan/Petrolether 1:1 noch weiter aufgereinigt werden. Die Reinheit

wurde HPLC-analytisch überprüft mittels zweier verschiedener Lösungsmittelgradienten. Hochauflösende Masse: ESI-MS:  $m/z$  401,1944 (berechnet 401,2001) (M).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ): 1,022 (t, 6 H); 3,308 (q, 2 H); 6,233 (s br, 1 H); 2,187 (t, 2 H); 1,9296 (q, 2 H); 6,6185 (d, 2 H); 7,0709 (d, 2 H); 3,187 (m, 8 H); 2,599 (m, 8 H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ): 11,496; 27,317; 34,022; 35,878; 36,6656; 40,479; 46,653; 51,462; 53,568; 112,776; 129,606; 130,800; 144,251; 172,762.

### Radioiodierung von Chlorambucil, Verbindung 1 und 2

Zu 20  $\mu\text{L}$  einer 10 mM Lösung der entsprechenden uniodierten Verbindung (**Chlorambucil**, Verbindung 1 oder 2) in Trifluoressigsäure wurden 10  $\mu\text{L}$  einer 10 mM  $\text{Ti}(\text{TFA})_3$  in Trifluoessigsäure gegeben. 10 Minuten später wurde die Lösung mit 10  $\mu\text{L}$   $[^{131}\text{I}]\text{Iod}$  (50 MBq) versetzt und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur reagieren lassen. Nachdem das Lösungsmittel am Ölpumpenvakuum entfernt worden war, erfolgte die Abtrennung der gewünschten Produkte auf einer analytischen RP 18 HPLC Säule unter Verwendung des folgenden Lösungsmittelgradienten: 60% auf 100% Methanol in TRIS Puffer über 30 Minuten bei einer Flussrate von 0,7 mL/min. Die aufgefangene Fraktion, die nur das gewünschte Produkt enthielt, wurde zur Trockne eingeeengt, in 0,9%iger NaCl-Lösung aufgenommen und sterilfiltriert. Die radiochemischen Ausbeuten betrugen 20-35 %, und die spezifischen Aktivitäten der trägerfreien Reaktionen lagen zwischen 70 und 90 GBq/ $\mu\text{mol}$  (berechnet).

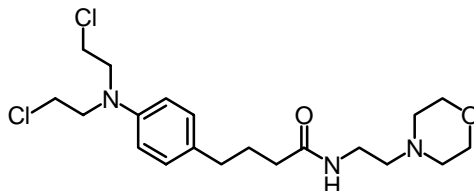
### 4-{4-[Bis(2-chlorethyl)amino]phenyl}-N-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl]butanamid (3)



Analog zur Synthese von Verbindung 1 wurde Chlorambucil mit 114 mg (1 mmol) 2-Pyrrolidin-1-yl-ethylamin konjugiert. Die Aufreinigung erfolgte ebenfalls wie die der Verbindung 1. Die Kristallisation und die nachfolgende Rekristallisation aus Dichlormethan/Petrolether (1:3) ergab 36 mg der Verbindung 3 (9 %). Mp. 89-90 °C.

ESI-MS:  $m/z$  400,1.  $(\text{M}+\text{H})^+$ . Anal. ( $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}$ ) berechnet: C; H; N: 60.00; 7.80; 10.49; gefunden: 60.06; 7.72; 10.56.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ): 1,788 (q, 4 H); 1,945 (q, 2 H); 2,179 (t, 2 H); 2,555 (m, 8 H); 3,3450 (q, 2 H); 3,651 (m, 8 H); 6,075 s (breit, 1 H); 6,616 (d, 2 H); 7,0690 (d, 2 H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ): 23,402; 27,273; 33,960; 35,771; 37,906; 40,451; 53,520; 53,767; 54,662; 112,110; 129,583; 130,755; 144,209; 172,688.

### 4-{4-[Bis(2-chlorethyl)amino]phenyl}-N-[2-(morpholino-1-yl)ethyl]butanamid (4)



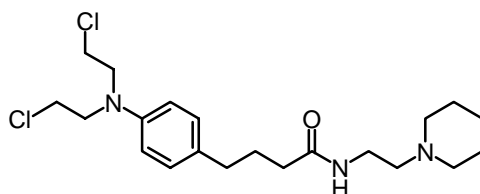
Analog zur Synthese von Verbindung 1 wurde Chlorambucil mit 130 mg (1 mmol) Morpholino-1-yl-ethylamin konjugiert. Die Aufreinigung erfolgte ebenfalls wie die der Verbindung 1. Die



Kristallisation und die nachfolgende Rekristallisation aus Dichlormethan/Petrolether (1:3) lieferte 29,5 mg (16,6%) **4**. Mp. 116°C.

ESI-MS:  $m/z$  416,0.  $(M+H)^+$ .  $^1H$ -NMR ( $\delta$ ;  $CDCl_3$ ): 1,9472 (quintett, 2 H); 2,1901 (t, 2 H); 2,4424 (t, 2 H); 2,4655 (t, 2 H); 2,5634 (t, 2 H); 3,3502 (q, 2 H); 3,6334 (t, 4 H); 3,6723 (t, 4 H); 3,7132 (t, 4 H); 5,9743 (s [breit], 1H); 6,62095 (d, 2 H); 7,0711 (d, 2 H).  $^{13}C$ -NMR ( $\delta$ ;  $CDCl_3$ ): 27,2133; 33,9014; 35,4485; 35,7144; 53,2207; 53,4341; 66,7269; 112,0689; 129,5028; 130,5915; 144,2073; 172,6116.

#### 4-{4-[Bis(2-chlorethyl)amino]phenyl}-N-[2-(piperidino-1-yl)ethyl]butanamid (**5**)

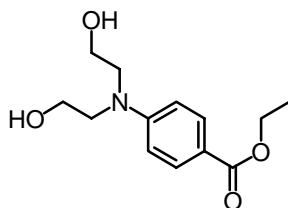


Entsprechend zur Synthese von Verbindung **1** wurde Chlorambucil mit 128 mg (1 mmol) Piperidino-1-yl-ethylamin konjugiert. Die Aufreinigung erfolgte desgleichen wie die der Verbindung **1**. Die Kristallisation und die darauf folgende Rekristallisation aus Dichlormethan/Petrolether (1:3) ergaben 71 mg (17 %) **5**.

ESI-MS:  $m/z$  416,0.  $(M+H)^+$ . Schmelzpunkt wurde nicht bestimmt.  $^1H$ -NMR (d;  $CDCl_3$ ): 1,9473 (quintett, 2 H); 2,1902 (t, 2 H); 2,4655 (m, 6 H); 2,5635 (t, 2 H); 3,3528 (q, 2 H); 3,6723 (m, 14 H); 5,9741 (s (breit), 1 H); 6,6209 (d, 2 H); 7,071 (d, 2 H).

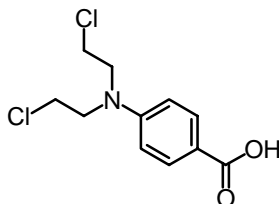
#### 5.2.1.2. Benzamide mit 4-[Bis-(2-chlorethyl)-amino]-Funktion

##### 4-[Bis(2-hydroxyethyl)amino]benzoesäure-ethylester **6** [29],[70],[71]



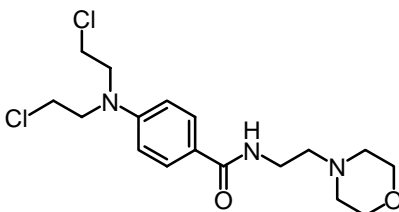
In einer Autoklavenapparatur wurden 8 g (48,5 mmol) 4-Aminobenzoesäure-ethylester in 64 mL 25% Essigsäure suspendiert, auf -20°C abgekühlt und schnell mit 5,3 g (121 mmol) gekühltem, flüssigem Ethylenoxid versetzt. Der Autoklav wurde verschlossen und das Reaktionsgemisch wurde 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Die resultierende Lösung wurde mit  $NaHCO_3$  alkalisiert und danach dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Durch Einengen der vereinigten organischen Extrakte wurden Kristalle erhalten, die aus Benzol umkristallisiert wurden, so dass 7.8 g (64 %) von Verbindung **6** erhalten wurden.

Mp: 93 °C (Lit. 93-94 °C)<sup>14</sup> ESI-MS:  $m/z$  254,1  $(M+H)^+$  and 276,0  $(M+Na)^+$ .  $^1H$ -NMR ( $\delta$ ;  $CDOD_3$ ): 1,320 (t, 3H); 3,583 (m, 4H); 3,722 (m, 4H); 4,252 (q, 2H); 6,7243 (d, 2H); 7,799 (d, 2H).

**4-[(Bis(2-chloroethyl)amino)]benzoesäure (7) [29],[70],[71]**

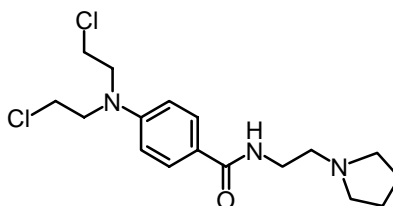
7.8 g (31.04 mmol) der Verbindung **6** wurden bei 4 °C mit 7 g (46.6 mmol) POCl<sub>3</sub> gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 Minuten lang refluxiert. Überschüssiges POCl<sub>3</sub> wurde am Ölpumpenvakuum entfernt. 24 mL konzentrierte Salzsäure wurden zu dem dadurch erhaltenen, braunen Öl gegeben und das resultierende Gemisch wurde 1 Stunde lang refluxiert. 5 mL Wasser wurden durch den Rückflußkühler hinzu gegeben und danach für weitere 20 Minuten refluxiert. Die ausgefallenen Kristalle wurden abfiltriert und aus Ethanol/Wasser 1:1 umkristallisiert, um 4.54 g **5** (56 %) zu ergeben. Mp: 172 °C (Lit. 172-173 °C)<sup>14</sup>.

ESI-MS: m/z 261,9 (M+H)<sup>+</sup> und 283,9 (M+Na<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (δ; CDCl<sub>3</sub>): 3,669 (t, 4 H); 3,819 (t, 4 H); 6,688 (d, 2 H); 8,002 (d, 2 H); 11,327 (breit; 0.5 H).

**4-[(Bis(2-chloroethyl)amino)]-N-(2-morpholinoethyl)benzamid (8)**

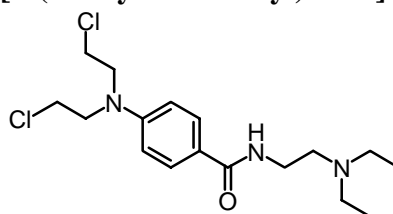
Analog zur Synthese von Verbindung **1** wurden 262 mg (1 mmol) **7** an 130 mg (1 mmol) 2-Morpholino-4-yl-ethylamin konjugiert. Durch Verwendung der für Verbindung **1** erwähnten säulenchromatografischen Bedingungen wurde Verbindung **8** als ein gelbes Öl erhalten, dessen Kristallisation aus einem Dichlormethan/Petrolether-Gemisch im Verhältnis 1:1 gelang. Es wurden 29 mg (7.8%) erhalten. Mp: 115 °C.

ESI-MS: m/z 374,0 (M+H)<sup>+</sup>. Anal. (C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) berechnet C; H; N: 54,55; 6,73; 11,23; gefunden: 54,45; 6,66; 11,22. <sup>1</sup>H-NMR (δ; CDCl<sub>3</sub>): 2,513 (t, 4 H); 2,601 (t, 2 H); 3,5388 (d, 2 H); 3,717 (m, 12 H); 6,665 (s (breit), 1 H); 7,000 (d, 2 H); 7,712 (d, 2 H).

**4-[Bis(2-chloroethyl)amino]-N-[2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl]benzamid (9)**

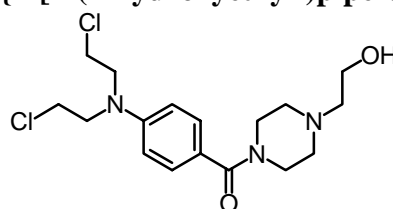
Unter Verwendung der Reaktionsbedingungen für Verbindung **1** wurden 262 mg (1 mmol) von Verbindung **7** mit 115 mg (1 mmol) 2-Pyrrolidin-1-yl-ethylamin verknüpft. Auch hier wurde das gleiche säulenchromatografische System wie zur Aufreinigung von Verbindung **1** verwendet. Das nach säulenchromatografischer Aufreinigung durch Lösungsmittel- evaporation erhaltene, gelbe Öl kristallisierte aus Dichloromethan/Petrolether (1:3). Man erhielt 40 mg (11.2 %) der Verbindung **9**. Mp: 90 °C.

ESI-MS:  $m/z$  378,0 (M+H)<sup>+</sup>. Anal. (C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O) berechnet C; H; N: 56,99; 7,03; 11,73; gefunden: 56,85; 6,95; 11,49. <sup>1</sup>H-NMR (δ, CDCl<sub>3</sub>): 1,796 (q, 4 H); 2,567 (t, 4 H); 2,700 (t, 2 H); 3,5341 (q, 2 H); 3,646 (t, 4 H); 3,757 (t, 4 H); 6,681 (d, 2 H); 6,711 (s br, 1 H); 7,721 (d, 2 H).

**4-[Bis(2-chloroethyl)amino]-N-[2-(diethylamino)ethyl]amin]benzamid (10) [29]**

Unter Verwendung der Reaktionsbedingungen für Verbindung **1** wurden 262 mg (1 mmol) von Verbindung **7** mit 116 mg (1 mmol) Diethylaminoethylamin verknüpft. Auch hier wurde das gleiche säulenchromatografische System wie zur Aufreinigung von Verbindung **1** verwendet. Das nach säulenchromatografischer Aufreinigung, durch Lösungsmittel- evaporation erhaltene, gelbe Öl ließ sich nicht kristallisieren. Es wurden 45 mg Öl (12,3 %) **10** erhalten.

DC: R<sub>f</sub> (Dichlormethan : Methanol : Triethylamin = 80 : 18 : 2) = 0,73. ESI-MS:  $m/z$  360,2 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (δ, CDCl<sub>3</sub>): 1,278 (t, 6 H); 2,937 (q, 4 H); 2,994 (q, 2 H); 3,706 (m, 10 H); 6,695 (d, 2 H); 7,909 (2 H); 7,919 (s (breit), 1 H).

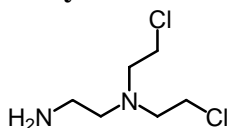
**4-[Bis(2-chloroethyl)amino]-N-{2-[4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl]}benzamid (11)**

Analog zur Synthese von Verbindung **1** wurden 262 mg (1 mmol) **7** an 130 mg (1 mmol) N-(2-Hydroxyethyl)piperazin konjugiert. Durch Verwendung der für Verbindung **1** erwähnten säulenchromatografischen Bedingungen wurde Verbindung **8** als ein gelbes Öl erhalten, dessen

Kristallisation aus einem Dichlormethan/Petrolether-Gemisch im Verhältnis 1:1 gelang. Es wurden 37,6 mg (10,1 %) erhalten. Mp. 118°C.

ESI-MS:  $m/z$  374,0 ( $M + H$ )<sup>+</sup>. Anal. ( $C_{17}H_{25}Cl_2N_3O_2$ ) berechnet C; H; N: 54,55; 6,73; 11,23; gefunden: 55,1; 6,8; 10,7. <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ ,  $CDCl_3$ ): 2,585 (m, 7H); 3,643 (m, 10 H); 3,769 (t, 4 H); 6,669 (d, 2 H); 7,367 (d, 2 H).

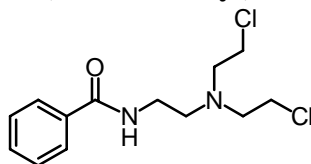
***N, N*-[Bis-(2-chlorethyl)]-ethylendiamin Hydrochlorid (12)**



Ein Rundkolben mit seitlichem Ansatzhahn wurde unter Vakuum ausgeglüht und nachfolgend unter Argonatmosphäre gesetzt. Unter Argongegenstrom wurden 500 mg (3,4 mmol) *N, N*-[Bis-(2-hydroxyethyl)]-ethylendiamin in den Kolben gegeben und anschließend mit einem Septum verschlossen. Das Reaktionsgefäß wurde auf einem Eis-Aceton-Bad auf 0°C gekühlt. Mittels einer Spritze wurde über das Septum 20 ml frisch destilliertes Thionylchlorid zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 8 Tage lang im Kühlschrank unter Argonatmosphäre bei 4°C aufbewahrt. Nachfolgend ließ man es noch 1, 5 Tage bei Raumtemperatur stehen. Thionylchlorid wurde am Ölpumpenvakuum entfernt. Das verbliebene orangefarbene Öl wurde in Ethanol aufgenommen (Ultraschall). Beim Stehenlassen fielen nach wenigen Minuten weiße Kristalle aus. Der Überstand wurde mit der Spritze entfernt. Die Kristalle wurden mehrmals mit Ethanol gewaschen, bis der Überstand keine Orangefärbung mehr aufwies. Danach wurde noch zweimal mit Ethanol gewaschen und der weiße Feststoff am Ölpumpenvakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 229,8 mg (37%) **12**. Mp 138°C (Lit. 139-140°C).

ESI-MS:  $m/z$  185,0. ( $M+H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ ;  $CDOD_3$ ): 3,4183 (t, 2 H); 3,0106 (t, 4 H); 3, 6757 (t, 2 H); 3, 9872 (t, 4 H). <sup>13</sup>C-NMR ( $\delta$ ,  $CDOD_3$ ): 35,3422; 38,2811; 51,8525; 56,3494.

**Versuch zur Synthese von *N*-{2-[Bis-(2-chloro-ethyl)amino]ethyl}benzamid (13)**



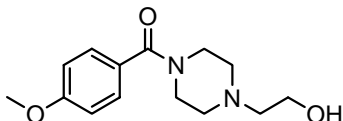
100 mg (0,54 mmol) **15** wurden in wenig Dichlormethan suspendiert, mit 2 mL 1 N NaOH versetzt und danach extrahiert. Die Dichlormethanphase wurde mittels einer Pasteurpipette abgetrennt und über eine mit Magnesiumsulfat gefüllte Pasteurpipette gedrückt. Das Filtrat wurde unter Kühlung zu einer Lösung von Benzoylchlorid in Dichlormethan getropft. Nach 20 Minuten wurde das Reaktionsgemisch trockengezogen.

ESI-MS:  $m/z$  261,2 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

Eine Aufreinigung war nicht möglich. Es wurde eine analytische HPLC-Trennung des Gemisches durchgeführt. Wenn der aufgefangene Produktpeak reinjiziert wurde, dann zeigten sich beim

folgenden HPLC-Lauf mehrere Peaks. Bei der Trennung über eine Kieselgelsäule zersetzte sich das Produkt. Die Aufreinigung mittels Umkristallisation war nicht möglich.

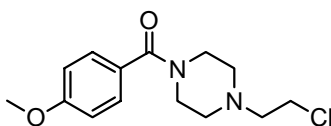
#### 4-Methoxy-*N*-{2-[4-(2-hydroxyethyl)]piperazin-1-yl}benzamid (**14**)



Unter Verwendung der Reaktionsbedingungen für Verbindung **1** wurden 500 mg 4-Methoxybenzoesäure (3,3 mmol) mit 428 mg (3,3 mmol) *N*-(2-Hydroxyethyl)piperazin verknüpft. Auch hier wurde das gleiche säulenchromatografische System wie zur Aufreinigung von Verbindung **1** verwendet. Das nach säulenchromatografischer Aufreinigung durch Lösungsmittelverdampfung erhaltene gelbe Öl kristallisierte aus Petrolether/Ethylacetat/Ethanol 1:1:1. Ausbeute: 209 mg (24%). Mp. 98°C.

ESI-MS:  $m/z$  265,0 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ ; CDOD<sub>3</sub>): 2,538 (m, breit, 6 H); 3,654 (breit, m, 6 H); 3,799 (s, 3 H); 7,337 (d, 2 H); 7,373 (d, 2 H).

#### 4-Methoxy-*N*-{2-[4-(2-chlorethyl)]piperazin-1-yl}benzamid (**15**)



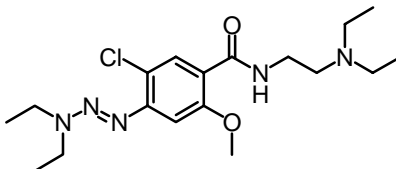
160 mg (60,6  $\mu$ mol) **14** wurden in 2 mL DCM gelöst. Die auf 0°C gekühlte Lösung wurde mit 0,5 mL TEA versetzt. Unter Rühren und Kühlung wurde eine Lösung von 72 mg Thionylchlorid in 2 mL DCM langsam zugetropft. Nachfolgend wurde 45 Minuten unter Rückfluß erhitzt.

Das Reaktionsgemisch wurde, nachdem es abgekühlt war, mit *n*-Pentan versetzt. Der abfiltrierte weiße Niederschlag wurde mehrmals aus Methanol/ Petrolether umkristallisiert, um 23 mg (13,2%) **15** zu ergeben.

ESI-MS:  $m/z$  283,5 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ ; CDOD<sub>3</sub>): 2,545 (m, breit, 6 H); 3,659 (breit, m, 6 H); 3,806 (s, 3 H); 7,336 (d, 2 H); 7,372 (d, 2 H).

### 5.2.1.3. Benzamide mit Triazenstruktur

#### 5-Chloro-*N*-[2-(diethylamino)ethyl]-4-(*N,N*-diethyltriazeno)-2-methoxybenzamid (**16**)

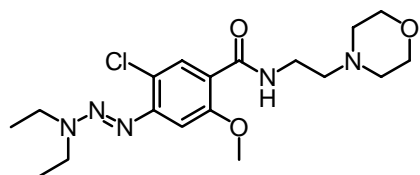


1,5 g (4,4 mmol) Metoclopramid Hydrochlorid wurden in 4 mL einer 3 M HCl bei 0°C mittels 307 mg Natriumnitrit (gelöst in 5 mL Wasser) diazotiert. Die wässrige Natriumnitritlösung wurde so hinzu getropft, dass die Temperatur des Reaktionsgemisches 5°C nicht überschritt. Es wurde

anschließend noch 30 Minuten bei 0°C nachgerührt. Eine Lösung von 321 Diethylamin (4,4 mmol) und 1,3 g NaHCO<sub>3</sub> in 5 mL Wasser wurde hergestellt und auf 0°C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurde die Lösung des diazotierten Metoclopramids getropft. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Kohlendioxidbildung moderat blieb. Es wurde noch 1 Stunde bei 0°C nachgerührt. Das Reaktionsgemisch wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert und nachfolgend am Ölpumpenvakuum evaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch eine Kieselgelsäulenchromatografie unter Verwendung von CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH:Et<sub>3</sub>N (97:2:1) als Elutionsmittel. Die kombinierten Fraktionen, die nur das Produkt enthielten, konnten zur Kristallisation gebracht werden, indem die zur Trockne eingeeengten, nur produkthaltigen Fraktionen mit einer Dichlormethan/Petrolether-Mischung im Verhältnis 1:1 überschichtet wurden. Die Rekristallisation aus Diethylether/n-Hexan 1:1. 505 mg (30 %). Mp: 102°C.

ESI-MS: m/z 384,2 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (δ; CDCl<sub>3</sub>): 1,046 (t, 6 H); 1,322 (breit, 6 H); 2,569 (q, 4 H); 2,631 (t, 2 H); 3,508 (q, 2 H); 3,831 (q, 4 H); 3,947 (s, 3 H); 7,052 (s, 1 H); 8,230 (s, 1 H); 8,357 (s, 1 H).

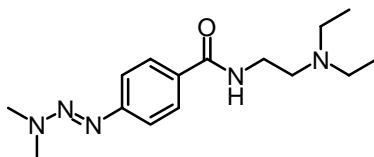
### 5-Chloro-*N*-[2-(morpholinoethylamino)]-4-(*N,N*-diethyltriazeno)-2-methoxybenzamid (17)



1,5 g (7,44 mmol) 4-Amino-5-chlor-2-methoxy-benzoesäure wurden mit 513,6 mg (7,44 mmol) NaNO<sub>2</sub> wie für Verbindung **16** beschrieben diazotiert. Die Bildung des entsprechenden Triazens erfolgte durch die Umsetzung der diazotierten 4-Amino-5-chlor-2-methoxy-benzoesäure mit 543 mg Diethylamin unter den gleichen Bedingungen wie für Verbindung **16** beschrieben. 5-Chlor-(*N,N*-diethyltriazeno)-2-methoxybenzoesäure wurde aus dem Reaktionsgemisch durch Ansäuern auf pH 3-4 ausgefällt. Das Filtrat wurde am Ölpumpenvakuum getrocknet. 1 g (3,5 mmol) 5-Chlor-(*N,N*-diethyltriazeno)-2-methoxybenzoesäure wurde mittels 1,33 g (3,5 mmol) HATU in 15 mL Acetonitril bei Raumtemperatur an 455 mg (3,5 mmol) 2-Morpholino-4-yl-ethylamin konjugiert.

Die Aufreinigung erfolgte durch eine Kieselgelsäulenchromatografie unter Verwendung von CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH:Et<sub>3</sub>N (97:2:1) als Elutionsmittel. Die kombinierten Fraktionen, die nur das Produkt enthielten, konnten zur Kristallisation gebracht werden, indem die zur Trockne eingeeengten, nur produkthaltigen Fraktionen mit einer Dichlormethan/Petrolether-Mischung im Verhältnis 1:1 überschichtet wurden. Die Rekristallisation aus Diethylether/n-Hexan 1:1. 505 mg (17 % bezogen auf 4-Amino-5-chlor-2-methoxybenzoesäure). Mp: 140 - 141 °C.

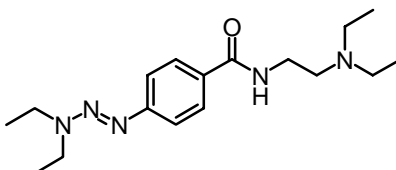
ESI-MS: m/z 398,2 (M+H)<sup>+</sup>. Anal. (C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>) berechnet C; H: 54,33; 7,09; gefunden: 54,03; 7,07. <sup>1</sup>H-NMR (δ; CDCl<sub>3</sub>): 1,295 (t, 6 H); 2,537 (t, 4 H); 2,605 (t, 2 H); 3,575 (q, 2 H); 3,752 (t, 4H); 3,839 (q, 4 H); 3,981 (s, 3 H); 7,058 (s, 1 H); δ 8,227 (s, 1 H); 8,304 (breit, 1 H).

***N*-[2-(Diethylamino)ethyl]-4-(*N,N*-dimethyltriazeno)benzamid (18)**

Procainamid wurde wie bereits für Verbindung **16** beschrieben diazotiert und anschließend in das entsprechende Triazen überführt, indem 331 mg (7,35 mmol) Dimethylamin in flüssiger Form mit dem diazotierten Procainamid unter Eiskühlung zur Reaktion gebracht wurden. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemischs erfolgte wie oben beschrieben.

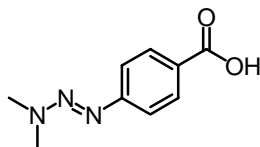
Ausbeute: 299 mg (14 %). Mp. 65°C.

ESI-MS:  $m/z$  292,1 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O) berechnet C; H; N: 61,83; 8, 65; 24,03 gefunden: 61, 95; 8, 87; 23, 78. <sup>1</sup>H-NMR (δ; CDCl<sub>3</sub>): 1,084 (t, 6 H); 2,638 (q, 4 H); 2,718 (t, 2 H); 3,374 (s, 6 H); 3,530 (q, 2 H); 7,066 (s, 1 H); 7,456 (d, 2 H); 7,784 (d, 2 H).

***N*-[2-(Diethylamino)ethyl]-4-(*N,N*-diethyltriazeno)benzamid (19)**

Procainamid wurde wie bereits für Verbindung **16** beschrieben diazotiert und anschließend in das entsprechende Triazen überführt, indem 537 mg (7,35 mmol) Diethylamin mit dem diazotierten Procainamid unter Eiskühlung zur Reaktion gebracht wurden. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemischs erfolgte wie oben beschrieben. Die Substanz wurde als ein Öl (562 mg, 20 %) erhalten.

Hochauflösende Masse: ESI-MS:  $m/z$  319,2379 (berechnet 319,237210) ( $M+H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (δ; CDCl<sub>3</sub>): 1,058 (t, 6 H); 1,263 (t, 6 H); 2,605 (q, 4 H); 2,688 (t, 2 H); 5,1023 (q, 2 H); 3,767 (q, 4 H); 7,250 (s, 1 H); 7,440 (d, 2 H); 7,634 (d, 2 H). <sup>13</sup>C-NMR (δ, CDCl<sub>3</sub>): 11,437; 37,034; 48,828; 51,533; 120,086; 127,654; 130,433; 153,546; 167,175.

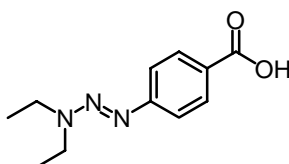
***N,N*-(Dimethyltriazeno)-2-methoxybenzoesäure (20) [75]**

1,2 g (6 mmol) 4-Aminobenzoesäure wurde in 6 mL wasserfreiem Dichlormethan und 2 mL wasserfreiem Acetonitril unter Inertgas gelöst. Danach wurde 1 mL TFA (1,2 mmol) durch das Septum zugetropft und das Reaktionsgemisch auf -20° abgekühlt. Die Diazotierung erfolgte durch tropfenweise Zugabe innerhalb von 10 Minuten von 1 mL Isopentylnitrit (1,2 mmol). Es wurde noch 1 Stunde lang bei -20°C nachgerührt. Danach wurde das Reaktionsgemisch auf

-80°C abgekühlt und mit wasserfreiem Diethylether versetzt, was zur Präzipitation eines weißen Niederschlages führte. Der Kolben wurde geschwenkt und unter Aufrechterhaltung der Kühlung und des Inertgasstromes wurde der Diethylether mit einer Spritze fast komplett entfernt. Der Feststoff wurde mehrmals mit Diethylether gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von Wasser und 282 mg (6 mmol) Dimethylamin. Das Triazen konnte durch Ansäuern des Reaktionsgemischs auf pH 3-4 ausgefällt werden. Ausbeute 602 mg (52 %).

ESI-MS:  $m/z$  194, 1 ( $M+H^+$ ).

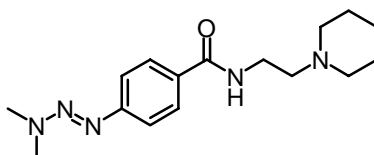
***N,N*-(Diethyltriazeno)-2-methoxybenzoesäure (21) [75]**



Die Synthese erfolgte analog zu der Synthese von Verbindung **20**. Statt Dimethylamin wurde jedoch Diethylamin (6 mmol) verwendet. Ausbeute: 636 mg (48 %).

ESI-MS:  $m/z$  222,3 ( $M+H^+$ ).

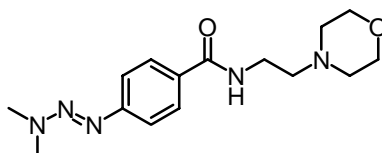
***N*-[2-(Piperidionoethylamino)]-4-(*N,N*-dimethyltriazeno)benzamid (22)**



500 mg (2,6 mmol) (*N,N*-Dimethyltriazeno)-2-methoxybenzoesäure wurden analog zu Verbindung **1** mit 333 mg (2,6 mmol) Piperidino-1-yl-ethylamin verknüpft. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemischs erfolgte wie bei Verbindung **16**. Ausbeute: 87 mg (11 %). Mp. 140°C.

ESI-MS:  $m/z$  304 ( $M+H^+$ ). Anal. ( $C_{16}H_{25}N_5O$ ) berechnet C; H; N: 63, 34; 8, 31; 23, 08 gefunden: 63, 19; 8, 44; 22, 81.  $^1H$ -NMR ( $\delta$ ;  $CDCl_3$ ): 2, 520 (t, 4 H); 2, 608 (t, 2 H); 3, 378 (breit, 8 H); 3, 556 (q, 2 H); 3, 734 (t, 4 H); 6, 714 (s, 1 H); 7, 465 (d, 2 H); 7, 751 (d, 2 H).

***N*-(2-(Morpholinoethylamino))-4-(*N,N*-dimethyltriazeno)benzamid (23)**

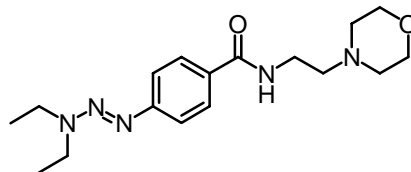


500 mg (2,6 mmol) (*N,N*-Dimethyltriazeno)-2-methoxybenzoesäure wurden analog zu Verbindung **1** mit 338 mg (2,6 mmol) Morpholino-1-yl-ethylamin verknüpft. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemischs erfolgte wie bei Verbindung **16**. Ausbeute 159 mg (20 %). Mp. 200 (decomp.).



ESI-MS:  $m/z$  306,1 ( $M+H^+$ ).  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ): 2,508 (t, 4 H); 2,601 (t, 2 H); 3,376 (s (breit) 6 H); 3,551 (q, 2 H); 3,731 (t, 4 H); 6,729 (s, 1 H); 7,464 (d, 2 H); 7,752 (d, 2 H).

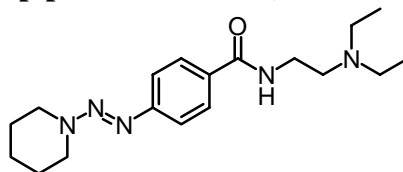
***N*-[2-(Morpholinoethylamino)-4-(*N,N*-diethyltriazeno)benzamid (24)**



500 mg (2,26 mmol) (*N,N*-Dimethyltriazeno)-2-methoxybenzoesäure wurden analog zu Verbindung **1** mit 294 mg (2,26 mmol) Morpholino-1-yl-ethylamin verknüpft. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemischs erfolgte wie bei Verbindung **16**. Ausbeute: 135 mg (17 %). Mp. 188°C.

ESI-MS:  $m/z$  334,1 ( $M+H^+$ ). Anal. ( $C_{17}H_{27}N_5O_2$ ) berechnet C; H; N: 61, 24; 8, 16; 21, 00; gefunden: 61, 03; 8, 23; 20, 84.  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ): (1,283 t, 6 H); 2,514 (t, 4 H); 2,608 (t, 2 H); 3,554 (q, 2 H); 3,734 (t, 4 H); 3,799 (q, 4 H); 6,750 (s, 1 H); 7,452 (d, 2 H); 7,751 (d, 2 H).

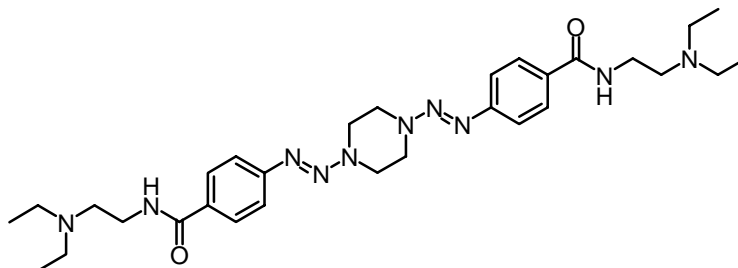
***N*-[2-(Diethylamino)ethyl]-4-(*N*-piperidinotriazeno)benzamid (25)**



Procainamid wurde wie bereits für Verbindung **16** beschrieben diazotiert und anschließend in das entsprechende Triazen überführt, indem 537 mg (7,35 mmol) Piperidin mit dem diazotierten Procainamid unter Eiskühlung zur Reaktion gebracht wurden. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemischs erfolgte wie für Verbindung **16**. Ausbeute: 238 mg (8,2 %).

ESI-MS:  $m/z$  332, 1 ( $M+H^+$ ). ( $C_{18}H_{29}N_5O$ ) berechnet C; H; N: gefunden: . MP: 88°C.  $^1H$ -NMR ( $\delta$ ;  $CDCl_3$ ): 1,041 (t, 6 H); 2,568 (q, 8 H); 2,647 (t, 4 H); 3,488 (q, 4 H); 6,866 p (s, 1 H); 7,459 (d, 2H); 7,755 (d, 2H).

***N,N'*-Bis{4-diazenyl-*N*-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid}piperazin (26)**

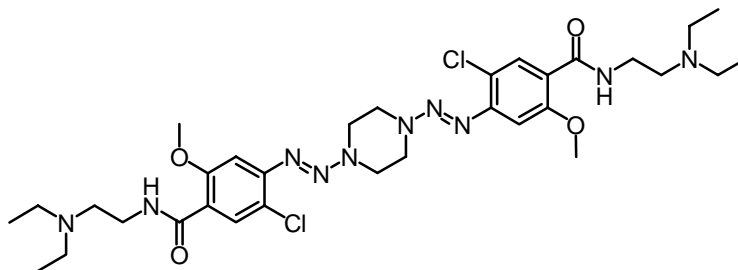


Die Diazotierung und Triazenbildung erfolgte unter den selben Reaktionsbedingungen wie für Verbindung **16** angegeben. 2 g (7.35 mmol) Procainamidhydrochlorid wurden mit 507 mg (7.35 mmol) Natriumnitrit diazotiert, und die Bildung des Triazens erfolgte durch die Reaktion des diazotierten Procainamids mit 316 mg (3,67 mmol) Piperazin. Das Reaktionsgemisch wurde

dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden zur Trockne eingeeengt und säulenchromatografisch aufgereinigt unter Verwendung von  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}:\text{Et}_3\text{N}$  (97:2:1) als Fließmittelgemisch. Aus den vereinigten, nur produkthaltigen Fraktionen wurden mittels einer Dichlormethan/Petrolether-Mischung im Verhältnis 1:1 Kristalle erhalten. Die Rekrystallisation aus Dichlormethan/n-Hexan lieferte 858 mg (20,2 %) **26**.

Mp: 200 °C (decomp.). ESI-MS:  $m/z$  579,4 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>. Anal. ( $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{N}_{10}\text{O}_2$ ) berechnet C; H; N: 62,26; 8,01; 24,20; gefunden: 62,07; 8,05; 23,92. <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ): 1,042 (t, 12 H); 2,573 (q, 8 H); 2,654 (t, 4 H); 3,484 (q, 4 H); 4,048 (s, 8 H); 7,065 (t, 2 H); 7,501 (d, 4 H); 7,812 (d, 4 H).

***N,N'*-Bis{4-diazenyl-*N*-[2-(diethylamino)ethyl]-5-chlor-2-methoxy-benzamid}piperazin (**27**)**

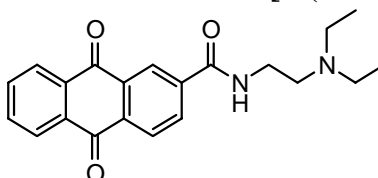


Es wurden die gleichen Reaktionsbedingungen wie für Verbindung **26** gewählt. Statt Procainamid wurden 2,2 g (7,35 mmol) Metoclopramidhydrochlorid verwendet. Ausbeute: 830 mg (16 %). Mp. 190°C.

ESI-MS:  $m/z$  707,3 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ ;  $\text{CDCl}_3$ ): 1,061 (t, 6 H); 2,578 (m, 6 H); 3,528 (q, 2 H); 3,971 (s, 3 H); 4,184 (s, 4 H); 7,089 (s, 1 H); 8,267 (s, 1 H); 8,368 (breit, 1 H).

**5.2.1.4. Benzamid mit Anthracyclinstruktur**

**9,10-Dioxo-9,10-dihydro-anthracen-2-carbonsäure-[2-(diethylamino)ethyl]-benzamid (**28**)**

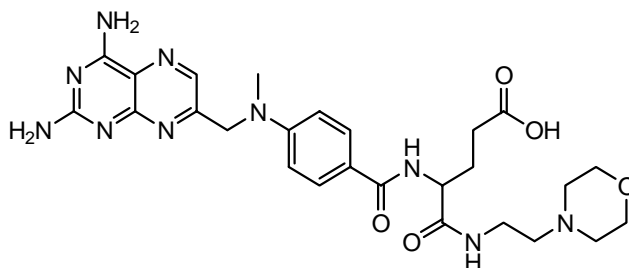


252 mg (1 mmol) 9,10-Dioxo-9,10-dihydro-anthracen-2-carbonsäure und 380 mg (1 mmol) HATU wurden in DMF gelöst. Danach wurden sofort 116 mg (1 mmol) Diethylaminoethylamin zugegeben. Die säulenchromatografische Aufreinigung mit dem gleichen chromatografischen Bedingungen und dem selben Lösungsmittelgemisch wie für Verbindung **1** lieferte nach Lösungsmittelavaporation 35 mg des Produktes (14 %).

ESI-MS:  $m/z$  351,2 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>. Die Reinheit wurde HPLC-analytisch überprüft mittels zweier verschiedener Lösungsmittelgradienten.

### 5.2.1.5. Benzamid-Methotrexat-Konjugate

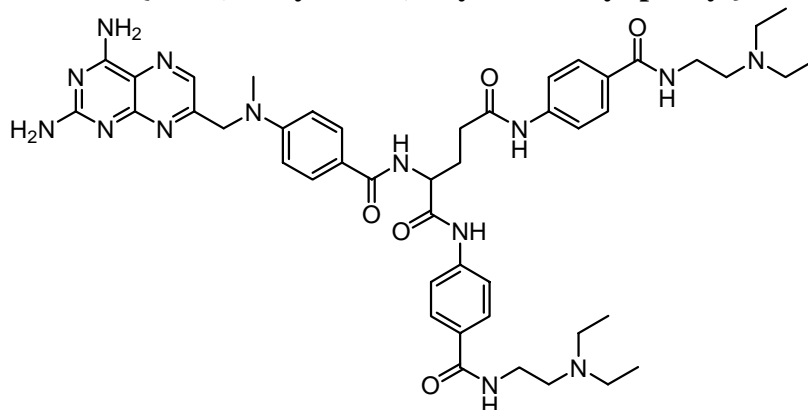
#### 4-{4-[2,4-(Diamino-pteridin-7-yl-methyl)-methyl-amino]-benzoylamino}-4-(2-morpholin-4-yl-ethylcarbamoyl)-buttersäure (29)



100 mg Methotrexat (0, 22 mmol) wurden in einen mit Aluminiumfolie umwickelten, ausgeglühten und mit Argon gespülten Rundkolben mit seitlichem Ansatzrohr gegeben. Dieser Kolben wurde unter Aufrechterhaltung des Argonstromes mit einem Septum verschlossen. Danach wurde Methotrexat in wasserfreiem DMF gelöst. Die Lösung wurde mittels eines externen Eis-Aceton-Bades auf 0° C abgekühlt. 50 mg DCC (0, 242 mmol/ 1, 1 Äquivalente) wurden 2 Tage lang am Hochvakuum getrocknet. Durch ein Septum wurde nach Abschluß der Trocknung wasserfreies DMF (1 ml) hinzu gegeben und nachfolgend 30 Minuten lang im Tiefkühlschrank bei -20°C gehalten. Danach wurde die Lösung mittels einer Spritze mit Kanüle aufgezogen und in den Kolben mit der Methotrexatlösung überführt. Das Reaktionsgemisch wurde nun 18 Stunden unter Argon bei 4° C in einem Kühlraum gerührt. Es hatte sich ein weißer Niederschlag gebildet. Dieser weiße Niederschlag wurde durch Filtration über eine mit Watte gefüllte Pasteurpipette entfernt. Das Filtrat wurde in einen mit Aluminiumfolie umwickelten Kolben gegeben, der 30 mg Morpholinoethylamin (0,22 mmol) enthielt. Es wurde 3 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und das Gemisch dann mit eisgekühltem Diethylether versetzt. HPLC-Untersuchungen ergaben, dass als Hauptprodukt nur ein Monokonjugat entsteht. Dieses wurde säulenchromatografisch auf Kieselgel mit einem Gemisch getrennt. Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels präparativer HPLC.

ESI-MS: m/z 567,3 (M+H<sup>+</sup>). Die Reinheit wurde mittels HPLC belegt.

**(4-[2,4-(Diaminopyrido[3,2-d]pyrimidin-7-yl-methyl)-methyl-]amino}-benzoylamino)-pentandicarbonsäure-bis-{4-[2-(diethylamino)ethylcarbamoyl]phenyl}-amid (30)**



Im mit Aluminiumfolie umwickelten Reaktionsgefäß wurde eine Lösung von 100 mg Methotrexat (0,22 mmol) in 2 mL wasserfreiem DMF mit 167 mg HATU (0,44 mmol) gemischt, gefolgt von der sofortigen Zugabe von 103 mg (0,44 mmol) Procainamid. Es wurde 2 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt, das Reaktionsgemisch mit Diethylether versetzt. Der Niederschlag wurde gesammelt und mittels präparativer HPLC getrennt.

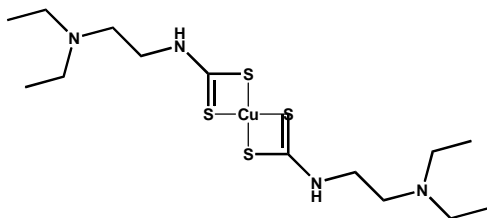
ESI-MS:  $m/z$  890,4 ( $M+H^+$ ). Die Reinheit wurde mittels zweier HPLC-Läufe mit unterschiedlichen Gradienten gezeigt.

#### 5.2.1.6. Dithiocarbamate

Versuche zur Synthese von Procainamiddithiocarbamat

- 1) 235 mg (1 mmol) Procainamid wurden in Ethanol gelöst. Zur eisgekühlten Lösung wurden 5 mL Schwefelkohlenstoff getropft. Es kam nicht zur Reaktion.
- 2) Unter Inertgas wurde in einem ausgeglühten Kolben tert. Butylkalium in wasserfreiem THF vorgelegt. Unter Eiskühlung wurde langsam eine Lösung von Procainamid in wasserfreiem THF so zugetropft, dass die Temperatur während des Zutropfens 0°C nicht überstieg. Nachdem insgesamt 50 mg Procainamid zugetropft worden waren, wurde noch eine Stunde lang bei Raumtemperatur nachgerührt. Unter erneuter Eiskühlung wurden 500  $\mu$ L Schwefelkohlenstoff, in wasserfreiem THF gelöst, langsam zugetropft. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Temperatur des Reaktionsgemisches 0°C nicht überstieg. Es wurde noch eine Stunde lang bei Raumtemperatur nachgerührt. Zum Schluß wurde noch 1 mL Wasser unter Eiskühlung zugetropft. Das gewünschte Produkt bildete sich nicht.

### Kupferkomplex von Diethylaminoethylamindithiocarbamat (31)



Zu einer eisgekühlten ethanolischen Lösung von 1,16 g (10 mmol) Diethylaminoethylamin wurden 5 mL Schwefelkohlenstoff getropft. Der ausfallende Niederschlag wurde abgesaugt und mehrmals mit Ethanol gewaschen. Das in 0,1 M KOH gelöste Produkt wurde mit Kupfer(II)kationen versetzt und mehrere Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Bei dem ausgefallenen Niederschlag handelt es sich um **31**.

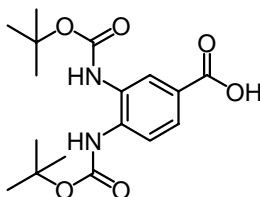
Freier Ligand: ESI-MS:  $m/z$  193,1 ( $M+H^+$ ). Kein NMR-Spektrum angefertigt, weil der Ligand unlöslich war; erst durch die Komplexbildung wurde er in DMSO löslich.

Komplex: ESI-MS:  $m/z$  449,2 ( $M+H^+$ ).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\delta$ ; dDMSO): 1,242 (t, 12 H); 3,147 (q, 8 H), 3,292 (t, 8H), 10,544 (s, 2H).

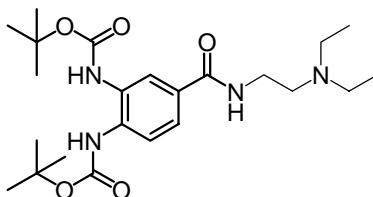
### 5.2.1.7. Platinkomplexe mit Benzamidstrukturelement

#### Diboc-3,4-Diaminobenzoesäure (32) [79]

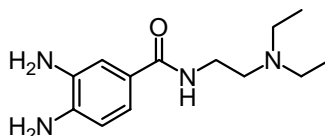


1,02 g (6,7 mmol) 3,4-Diaminobenzoesäure wurden mit 3,27 g (15 mmol) Boc-Anhydrid in 30 mL DMF für 24 Stunden umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatografisch unter Verwendung von DCM:MeOH:TEA (70:28:2) als Fließmittelgemisch und von Kieselgel als stationärer Phase.

#### Diboc-3,4-Diamino-*N*-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid (33) [79]



550 mg **32** (1,56 mmol) wurden in Acetonitril gelöst und mit 594 mg (1,56 mmol) HATU versetzt, gefolgt von 182 mg (1,56 mmol) Diethylaminoethylamin. Nach einer einstündigen Reaktionszeit erfolgte die Aufreinigung säulenchromatografisch (Kieselgel; Fließmittel: DCM:MeOH:TEA = 80:18:2).

**3,4-Diamino-N-[2-(diethylamino)ethyl]-benzamid (34) [79]**

300 mg **33** in 50 mL MeOH gelöst und mit 5 mL 25%iger Salzsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2 Stunden lang auf 70°C erhitzt. Nach Evaporation des Lösungsmittels erfolgte die Kristallisation aus Methanol und Diethylether.

Mp. 214°C. ESI-MS: m/z 251,2 ( $M+H^+$ ).

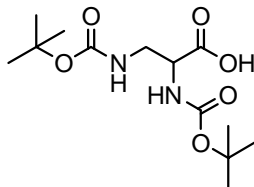
**Versuche zur Komplexierung von Platin mittels 3,4-Diamino-N-[2-(diethylamino)ethyl]-benzamid**

25,2 mg (0,1 mmol) 3,4-Diamino-N-(2-diethylaminoethyl)-benzamid und 51,4 mg Kaliumtetrachloroplatinat(II) (0,1 mmol) wurden in Wasser gelöst und mit verdünnter NaOH auf pH=6 eingestellt. Die Lösung wurde 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Dabei kam es zur Bildung eines Niederschlages. Eine Aufreinigung mißlang. Es kam zu Farbveränderungen während der Synthese und bei den Aufarbeitungsversuchen, die in der Umkristallisation des Präzipitates aus DMSO und DMF bestanden.

**Versuch zur Oxidation von 3,4-Diamino-N-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid durch Luftsauerstoff**

3,4-Diamino-N-(2-diethylaminoethyl)-benzamid wurde bei pH=8 in wäßriger Lösung 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Dabei kam es zu einer Rotfärbung der Lösung.

ESI-MS: m/z 249,2 ( $M+H^+$ ).

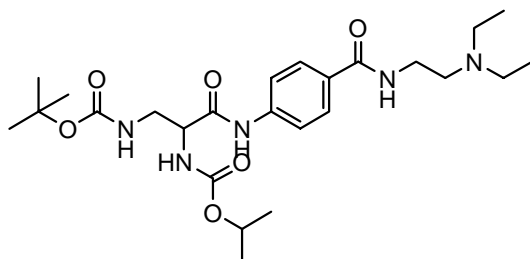
**Diboc-2,3-Diaminopropionsäure (35) [83]**

100 mg 2,3-Diaminopropionsäurehydrochlorid wurden in 1,2 mL 1 M NaHCO<sub>3</sub> und 1,4 mL tert. Butanol gelöst. 620 mg Boc-Anhydrid wurde in wenig tert. Butanol gelöst und schnell zur oben genannten Lösung getropft. Durch die nachfolgende Zugabe von Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> wurde der pH-Wert auf 9 eingestellt. Nach 15stündiger Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel am Ölpumpenvakuum fast komplett abgezogen. Der in Wasser aufgenommene Rückstand wurde dreimal mit n-Pentan extrahiert. Die wäßrige Phase wird anschließend mit KHSO<sub>4</sub> auf pH = 3 eingestellt und zweimal

mit Ethylacetat extrahiert. Die über Natriumsulfat getrocknete Ethylacetatphase wurde evaporiert. Das verbleibende Öl wurde aus Petrolether kristallisiert.

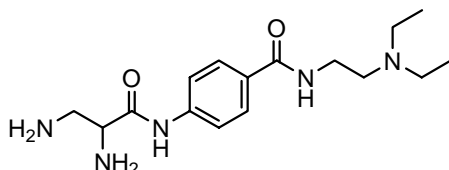
ESI-MS:  $m/z$  303,0 ( $M+H^+$ ).

**Diboc-4-[2,3-(Diaminopropionyl)amino]-N-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid (36)**



302 mg (1 mmol) Diboc-2,3-Diaminopropionsäure und 380 mg (1 mmol) HATU wurden in 5 mL Acetonitril gelöst. Danach wurden sofort 235 mg (1 mmol) Procainamid hinzu gegeben. Nach einstündiger Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel abgezogen und das Reaktionsgemisch säulenchromatografisch aufgereigt (DCM:MeOH:TEA = 80:18:2 und Kieselgel).

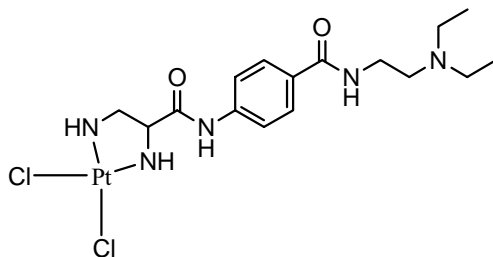
**4-[2,3-(Diaminopropionyl)amino]-N-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid (37)**



96 mg **36** wurden in 5 mL MeOH gelöst und mit 1 mL 25%iger Salzsäure 2 Stunden lang refluxiert. Nach Lösungsmittelveaporation erfolgte die Kristallisation aus Methanol und Diethylether (1:1).

ESI-MS:  $m/z$  292,2 ( $M+H^+$ ).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\delta$ ; dDMSO): 1,305 (t,6H); 3,305 (m,7H); 3,521 (q,2H); 3,717 (q,2H); 4,543 (t,1H); 7,845 (d,2H); 7,981 (d,2H); 8,944 (s,1H).

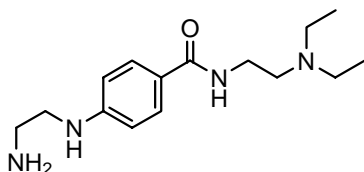
**(Dichloro-{4-[2,3-(Diaminopropionyl)amino]}-N-[2-(diethylamino)ethyl]benzamido)-Platinat (II) (38) [122; bezieht sich auf die Synthesemethode]**



29,1 mg (0,1 mmol) **37** und 415 mg Kaliumtetrachloroplatinat(II) (0,1 mmol) wurden in Wasser gelöst und mit verdünnter NaOH auf pH=6 eingestellt. Die Lösung wurde 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Dabei kam es zur Bildung eines Niederschlages. 15,2 mg (26 %).

ESI-MS:  $m/z$  586,1 ( $M+H^+$ ). Die Reinheit wurde HPLC analytisch gezeigt.

#### 4-[2-(Amino-ethyl)amino]-N-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid (**39**)

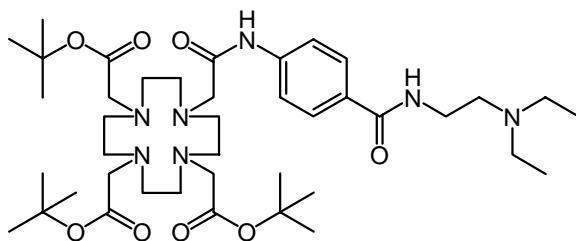


100 mg (1,14 mmol) 2-Oxazolidinon und 312 mg (1,14 mmol) Procainamidhydrochlorid wurden in 3 mL 2-(2-Methoxyethoxy)ethanol auf dem Ölbad unter Rühren auf 170°C erhitzt. Durch die tropfenweise Zugabe von konzentrierter Salzsäure kam es zu einem starken Aufschäumen. Nachdem das Schäumen komplett aufgehört hatte, wurde erneut ein Tropfen konzentrierte Salzsäure zugegeben. Immer nachdem das Schäumen aufgehört hatte, wurde 1 Tropfen konzentrierte Salzsäure zugesetzt. Dies wurde über einen Zeitraum von 2 Stunden wiederholt. Anschließend wurde noch 30 Minuten erhitzt. Die Aufreinigung des Reaktionsgemisches erfolgte säulenchromatografisch. Zunächst wurde DCM:MeOH:TEA = 80:18:2 solange verwendet, bis Procainamid komplett eluiert war. Danach wurde mit MeOH+TEA = 250 + 2 weiter eluiert. Das Produkt wurde aus Methanol/Diethylether kristallisiert. Es wurden 106 mg (=33 %) 4-(2-Amino-ethylamino)-N-(2-diethylamino-ethyl)-benzamid erhalten.

ESI-MS:  $m/z$  279,4 ( $M+H^+$ ).  $^1H$ -NMR ( $\delta$ ; CDOD<sub>3</sub>): 0,999 (t, 6H); 2,529 (m, 8 H); 2,785 (t, 2H); 3,164 (q, 2 H); 7,566 (d, 2H); 7,601 (d, 2H).

#### 5.2.2. Gadoliniumkomplexe

##### {[1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7-tris(essigsäure-t-butylester)]-10-acetamid}- N-[2-(diethylamino)ethyl]benzamid (**40**)

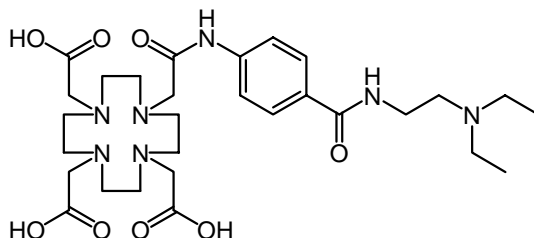


380 mg (1 mmol) HATU und 572 mg DOTA-tris(t-Bu)-Ester (1 mmol) wurden in 3 mL CH<sub>3</sub>CN gelöst. 272 mg (1 mmol) Procainamidhydrochlorid wurden mittels Diisopropylethylamin in 2 mL CH<sub>3</sub>CN in Lösung gebracht. Die HATU/ DOTA-tris(t-Bu)-Ester-Lösung wurde zur Procainamidlösung gegeben und drei Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Lösungsmittel am Ölpumpenvakuum abgezogen worden war, erfolgte die



säulenchromatografische Aufreinigung auf Kieselgel mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}:\text{Et}_3\text{N}$  (70:28:2) als Lösungsmittelgemisch. Aus den Fraktionen, die nur das Produkt enthielten, wurde durch Entfernen des Lösungsmittels **40** erhalten. ESI-MS:  $m/z$  790,6 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> und 395,2 ( $\text{M}+2\text{H}$ )<sup>2+</sup>.

**[1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7-tris(essigsäure)-10-acetamid]- N-[2-(diethyl-aminoethyl)]benzamid (**41**)**



790 mg (1 mmol) **40** wurden mit 20 mL TFA, 2 mL Aqua bidest. und 300  $\mu\text{L}$  Triisopropylsilan 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Ölpumpenvakuum entfernt. Die Kristallisation gelang aus Methanol: Ethylacetat: Chloroform = 1:1:1. Die Rekristallisation aus dem gleichen Lösungsmittelgemisch lieferte 105,7 mg (17 %).

ESI-MS:  $m/z$  622,4 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> und 311,8 ( $\text{M}+2\text{H}$ )<sup>2+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ ;  $\text{CDOD}_3$ ): 1,378 (t, 6H); 3,349 (m, 24 H); 3,789 (t, 2H); 3,919 (q, 2H); 4,095 (q, 4H); 7,884 (d, 2H); 7,900 (d, 2H).

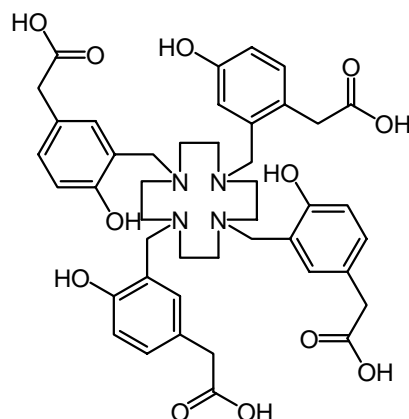
Die Reinheit wurde HPLC-analytisch überprüft mittels zweier verschiedener Lösungsmittelgradienten.

**Gadoliniumkomplex von [1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7-tris(essigsäure)-10-acetamid]- N-[2-(diethyl-aminoethyl)]benzamid (**42**)**

Eine Lösung von 105 mg (0,17 mmol) **41** und 56 mg (0,17 mmol) Gadoliniumacetat in 5 mL Aqua bidest. wurde 24 Stunden lang refluxiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels präparativer HPLC auf einer Rp18-Säule als stationärer Phase und als Fließmittelgemisch diente 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser (A) und 0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril (B). Der gewählte Gradient war 0 % auf 100 % B in 30 Minuten bei einer Flussrate von 3 mL/min. Ausbeute 10,5 mg (8 %).

Hochauflösende Masse: ESI-MS:  $m/z$  776,2494 (M). Die Reinheit wurde HPLC-analytisch überprüft.

**Versuche zur Synthese von {4-Hydroxy-3-[4,7,10-tris-(5-carboxymethyl-2-hydroxy-benzyl)-1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl-methyl]-phenyl}-essigsäure**



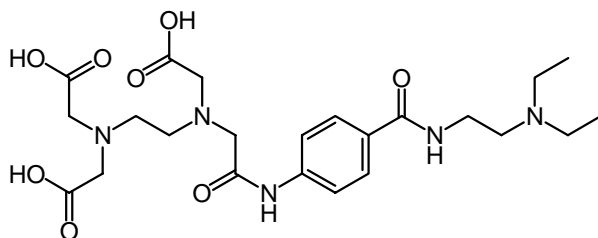
609 mg 4-Hydroxyphenylessigsäure (4 mmol) wurden in Methanol, Wasser und 1 N NaOH gelöst. Mit 4 N NaOH wurde der pH-Wert auf 8 eingestellt. Zu der auf dem Eisbad gekühlten Lösung wurden 172 mg Cyclen (1 mmol) und portionsweise 324 mg (4 mmol) 37%ige Formalinlösung gegeben. Nachdem die komplette Formaldehydmenge zugegeben worden war, wurde das Reaktionsgemisch drei Stunden lang refluxiert.

ESI-MS:  $m/z$  337,2 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

**Variation des pH-Wertes**

609 mg 4-Hydroxyphenylessigsäure (4 mmol) wurden in Methanol, Wasser und 1 N NaOH gelöst. Mit Salzsäure wurde der pH-Wert bei Versuch 2.1 auf pH=3; bei Versuch 2.2 auf pH=4; bei Versuch 2.3 auf pH=5 und bei Versuch 2.4 auf pH=6 eingestellt. Zu der auf dem Eisbad gekühlten Lösung wurden 172 mg Cyclen (1 mmol) und portionsweise 324 mg (4 mmol) 37%ige Formalinlösung gegeben. Nachdem die komplette Formaldehydmenge zugegeben worden war, wurde das Reaktionsgemisch drei Stunden lang refluxiert. Allerdings bildete sich auch hier hauptsächlich nur [4-Hydroxy-3-(1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl-methyl)-phenyl]-essigsäure.

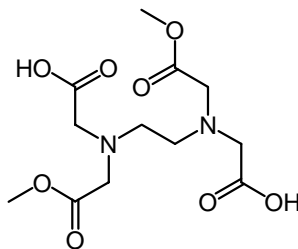
**EDTA-Procaïnamid (43)**



256 mg (1 mmol) EDTA-dianhydrid wurden mit 235 mg (1 mmol) Procainamid 30 Minuten bei Raumtemperatur in wasserfreiem DMF gerührt. Danach wurde Wasser zugesetzt und noch weitere 30 Minuten gerührt. Die Aufreinigung erfolgte mittels präparativer HPLC auf einer Rp18-Säule als stationärer Phase und als Fließmittelgemisch diente 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser (A) und 0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril (B). Der gewählte Gradient war 0 % auf 100 % B in 30 Minuten bei einer Flussrate von 3 mL/min.

Hochauflösende Masse: ESI-MS:  $m/z$  509,253 (M). Die Reinheit wurde mittels HPLC gezeigt.

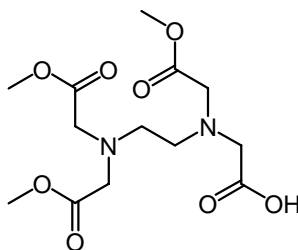
#### EDTA-tetramethylester (44)



2,92 mg (10 mmol) EDTA wurden in 3 mL Methanol gelöst. Nach der Zugabe von 0,5 mL konzentrierter Schwefelsäure wurde das Reaktionsgemisch 3 Stunden lang unter Rückfluß erhitzt. Die saure Lösung wurde nach dem Abkühlen mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  basisch gemacht und dreimal mit Ethylacetat extrahiert.

ESI-MS:  $m/z$  349,2 (M+H)<sup>+</sup>.

#### EDTA-trimethylester (45) [88]



349 mg (1 mmol) EDTA-tetramethylester und 133 mg  $\text{CuCl}_2$  (1 mmol) wurden in 1 mL Wasser gelöst. Eine Lösung von 40 mg NaOH in 500  $\mu\text{L}$  Wasser wurde tropfenweise so hinzu gegeben, dass der pH-Wert bei 5 gehalten wurde. Danach wurde solange  $\text{H}_2\text{S}$  in die Lösung eingeleitet, bis kein schwarzer  $\text{CuS}$ -Niederschlag mehr entstand (so lange  $\text{H}_2\text{S}$  einleiten, bis das Filtrat klar bleibt). Das klare Filtrat wurde lyophilisiert.

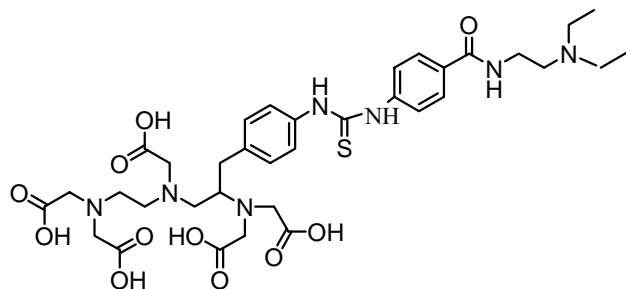
ESI-MS:  $m/z$  335,1 (M+H)<sup>+</sup>.

#### EDTA-Procaïnamid (43)

349 mg (1 mmol) EDTA-tetramethylester wurde mit 380 mg HATU (1 mmol) an 235 mg (1 mmol) Procainamid gekoppelt. Das Produkt wurde säulenchromatografisch von den Edukten abgetrennt. Dazu diente Kieselgel als stationäre Phase und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}:\text{Et}_3\text{N}$  (80:18:2) als Lösungsmittelgemisch. Nach der Evaporation des Lösungsmittels wurde das ölige Produkt 30 Minuten lang mit 3 N NaOH refluxiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels präparativer HPLC auf einer Rp18-Säule als stationärer Phase und als Fließmittelgemisch diente 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser (A) und 0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril (B). Der gewählte Gradient war 0 % auf 100 % B in 30 Minuten bei einer Flussrate von 3 mL/min.

Hochauflösende Masse: ESI-MS:  $m/z$  509,253 (M). Die Reinheit wurde mittels HPLC gezeigt.

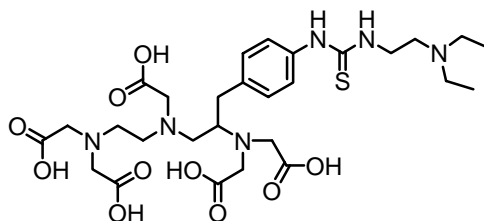
**(2-(Bis-carboxymethyl-amino)-3-{4-[3-(2-diethylamino-ethyl)-thioureido]-phenyl}-propyl)-[2-(bis-carboxymethyl-amino)-ethyl]-amino}-essigsäure (46)**



540 mg (1 mmol) 4-Isothiocyanatobenzyl-diethyl-triamine-pentaessigsäure wurden in wasserfreiem DMSO gelöst. Bei Raumtemperatur erfolgte die tropfenweise Zugabe einer Lösung von 235 mg (1 mmol) Procainamid in wasserfreiem DMSO. Es wurde noch 5 Stunden bei Raumtemperatur nachgerührt. Das Produkt wurde mit Diethylether aus dem Reaktionsgemisch ausgefällt. Das Präzipitat wurde in 0,1 N NaOH gelöst und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels präparativer HPLC auf einer  $R_{p18}$ -Säule mit Acetonitril/Wasser 80:20 (Fließmittel B) und 0,1% HCl in Wasser (Fließmittel A) als Fließmittel. Gradient: 1% Fließmittel B auf 50% Fließmittel B in 30 Minuten.

ESI-MS:  $m/z$  776,4 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. Die Reinheit wurde mittels HPLC gezeigt.

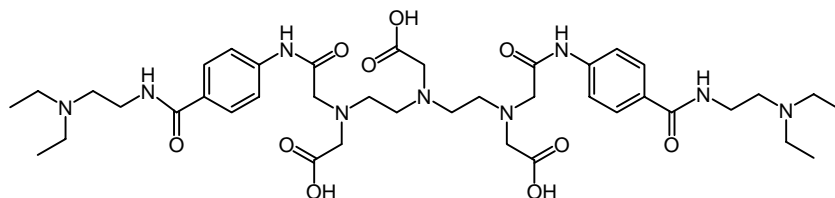
**{[2-(Bis-carboxymethyl-amino)-3-(4-{3-[4-(2-diethylamino-ethylcarbamoyl)-phenyl]-thioureido}-phenyl)-propyl]-[2-(bis-carboxymethyl-amino)-ethyl]-amino}-essigsäure (47)**



540 mg (1 mmol) 4-Isothiocyanatobenzyl-diethyl-triamine-pentaessigsäure wurden in wasserfreiem DMSO gelöst. Bei Raumtemperatur erfolgte die tropfenweise Zugabe einer Lösung von 235 mg (1 mmol) Procainamid in wasserfreiem DMSO. Es wurde noch 5 Stunden bei Raumtemperatur nachgerührt. Das Produkt wurde mit Diethylether aus dem Reaktionsgemisch ausgefällt. Das Präzipitat wurde in 0,1 N NaOH gelöst und dreimal mit Dichlormethan extrahiert.

ESI-MS:  $m/z$  655,2 ( $M-H$ ).

**{Bis-[2-(carboxymethyl)-{4-(2-diethylamino-ethylcarbamoyl)-phenylcarbamoyl]-methyl}-amino)-ethyl]-amino}-essigsäure (48)**



Eine Lösung von 357 mg (1 mmol) DTPA-dianhydrid in wasserfreiem DMF wurde unter Argonatmosphäre mit 544 mg (2 mmol) Procainamid versetzt. Die Suspension wurde 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die 24 Stunden um waren, wurden 2 mL Wasser hinzuge tropft und für weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Ölpumpenvakuum entfernt, der Rückstand in Methanol aufgenommen und mittels präparativer DC auf Kieselgel, unter Verwendung von  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}:\text{Et}_3\text{N}$  (80:18:2) als Fließmittelgemisch, aufgereinigt. Das Produkt wurde mittels Methanol aus dem Kieselgel eluiert.

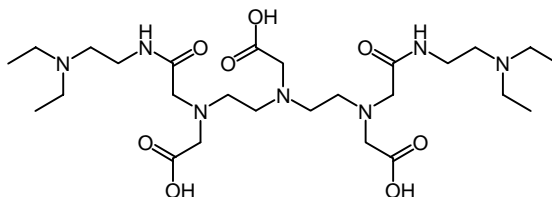
ESI-MS:  $m/z$  828,5 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\delta$ ; d-DMSO): 11,662; 37,281; 46,679; 51,399; 52,072; 59,883; 60,096; 62,813; 69,700; 118,566; 127,576; 128,689; 141,797; 165,698; 170,697; 174,661. Die Reinheit wurde mittels HPLC überprüft.

**Gadoliniumkomplex von {Bis-[2-(carboxymethyl)-{4-(2-diethylamino-ethylcarbamoyl)-phenylcarbamoyl]-methyl}-amino)-ethyl]-amino}-essigsäure (50)**

83 mg (0,1 mmol) **45** und 33,4 mg Gadoliniumacetat (0,1 mmol) in Wasser wurden 24 Stunden lang refluxiert. Das Produkt fiel während des Refluxierens aus der wässrigen Lösung als weißer Niederschlag aus, wohingegen die Edukte in Lösung blieben. Ausbeute = 4,5 mg (4,6%).

Hochauflösende Masse: ESI-MS:  $m/z$  982,3604 (berechnet 9825,3557) (M). Die Reinheit wurde mittels zweier HPLC-Läufer gezeigt.

**[Bis-(2-{carboxymethyl}-[(2-diethylamino-ethylcarbamoyl)-methyl]-amino)-ethyl)-amino]-essigsäure (49)**



Eine Lösung von 357 mg (1 mmol) DTPA-dianhydrid in wasserfreiem DMF wurde unter Argonatmosphäre mit 232 mg (2 mmol) Diethylaminoethylamin versetzt. Die gelbe Lösung wurde 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die 24 Stunden um waren, wurden 2 mL Wasser hinzuge tropft und für weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Ölpumpenvakuum entfernt, der Rückstand in Methanol aufgenommen und mittels präparativer DC auf Kieselgel unter Verwendung von  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}:\text{Et}_3\text{N}$  (80:18:2)

als Fließmittelgemisch aufgereinigt. Das Produkt wurde mittels Methanol aus dem Kieselgel eluiert.

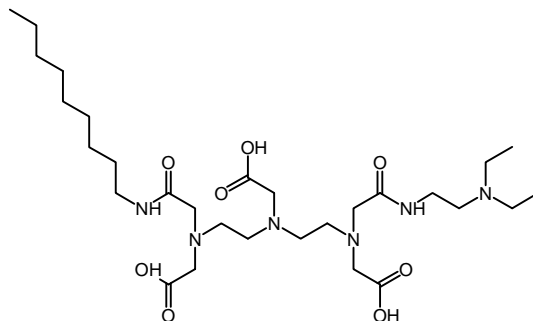
ESI-MS:  $m/z$  590,4 ( $M+H^+$ ).  $^{13}C$ -NMR ( $\delta$ ; d-DMSO): 7,211; 40,495; 46,242; 48,395; 52,121; 62,902; 171,149; 174, 134.

**Gadoliniumkomplex von [Bis-(2-{carboxymethyl-[(2-diethylamino-ethylcarbamoyl)-methyl]-amino}-ethyl)-amino]-essigsäure (51)**

66,1 mg (0,1 mmol) **43** und 33,4 mg Gadoliniumacetat (0,1 mmol) in Wasser wurden 24 Stunden lang refluxiert. Das Produkt fiel während des Refluxierens aus der wässrigen Lösung als weißer Niederschlag aus, wohingegen die Edukte in Lösung blieben. Ausbeute = 5,9 mg (7,9%).

Hochauflösende Masse: ESI-MS:  $m/z$  744,2876 (berechnet 744,2812) (M). Das Massenspektrum zeigte keine anderen Peaks außer dem Produktpeak.

**{(2-{Carboxymethyl-[2-diethylamino-ethylcarbamoyl]-methyl]-amino}ethyl)-[2-(carboxymethylnonyl- carbamoyl-methyl-amino)-ethyl]amino}-essigsäure (52)**



Eine Lösung von 357 mg (1 mmol) DTPA-dianhydrid in wasserfreiem DMF wurde unter Argonatmosphäre mit 116 mg (1 mmol) Diethylaminoethylamin und 143,2 mg (1 mmol) Nonylamin versetzt. Die Suspension wurde 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die 24 Stunden um waren, wurden 2 mL Wasser hinzuge tropft und für weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Ölpumpenvakuum entfernt, der Rückstand in Methanol aufgenommen und mittels präparativer DC auf Kieselgel unter Verwendung von  $CH_2Cl_2:CH_3OH:Et_3N$  (80:18:2) als Fließmittelgemisch aufgereinigt. Das Produkt wurde mittels Methanol aus dem Kieselgel eluiert.

ESI-MS:  $m/z$  590,4 ( $M+H^+$ ).  $^1H$ -NMR ( $\delta$ ;  $D_2O$  und d-DMSO): 0,964 (t, 6H), 1,354 (t, 3H), 3,376 (m, 42 H), 8,213 (s, 1H), 8,237 (s, 1H), 8,279 (s, 1H), 8,778 (s, 1 H), 8,880 (s, 1H).

**Gadoliniumkomplex von {(2-{Carboxymethyl-[2-diethylamino-ethylcarbamoyl]-methyl}-amino)ethyl)-[2-(carboxymethylnonyl- carbamoyl-methyl-amino)-ethyl]amino}-essigsäure (53)**

66,1 mg (0,1 mmol) **43** und 33,4 mg Gadoliniumacetat (0,1 mmol) in Wasser wurden 24 Stunden lang refluxiert. Das Produkt fiel während des Refluxierens aus der wässrigen Lösung als weißer Niederschlag aus, wohingegen die Edukte in Lösung blieben. Ausbeute = 4,3 mg (5,6 %).

Hochauflösende Masse: ESI-MS: m/z 771,3229 (berechnet 771,3173) (M). Das Massenspektrum zeigte keinen anderen Peak als den Produktpeak.

**Versuche zur Synthese eines Cholesterinderivates**

- 1) 92 mg (0,2 mmol) 5-Cholesten-3 $\beta$ -[N-phenyl]amin wurden in wasserfreiem DCM gelöst. Danach wurde eine Lösung von 35 mg (0,1 mmol) DTPA-dianhydrid zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur gerührt. Da es nicht zur Reaktion kam, wurde das Reaktionsgemisch 24 Stunden lang auf 80°C erhitzt. Dies führte auch nicht zum Erfolg.
- 2) 92 mg (0,2 mmol) 5-Cholesten-3 $\beta$ -[N-phenyl]amin wurden in wasserfreiem DCM gelöst. Danach wurde eine Lösung von 35 mg (0,1 mmol) DTPA-dianhydrid zugetropft. Schließlich wurden noch 5 mg DMAP zugesetzt und das Reaktionsgemisch wurde 24 Stunden lang auf 80°C erhitzt. Auch unter diesen Bedingungen blieb die Bildung des gewünschten Produktes aus.
- 3) 57 mg (0,1 mmol) DOTA tis.(tert. butylester) und 38 mg (0,1 mmol) HATU wurden in Acetonitril gelöst. Anschließend wurden 46 mg 5-Cholesten-3 $\beta$ -[N-phenyl]amin hinzu gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es kam nicht zur Konjugation.

**Vorversuch zur Synthese und zur Komplexierung eines Polyargininkonjugates**

52 mg (0,1 mmol) 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,7-bis(essigsäure-t-butylester)-4,10-diessigsäure wurden in Acetonitril mittels 76 mg (0,2 mmol) HATU an 47 mg (0,2 mmol) Procainamid gekoppelt. Die anschließende säulenchromatografische Aufreinigung (stationäre Phase = Kieselgel; mobile Phase = Dichlormethan/Methanol/Triethylamin = 70/28/2) lieferte DOTA-bis-(tert. butylester)-bis-Procainamid. Die Hydrolyse der beiden tert. Butylesterguppen gelang bei Raumtemperatur durch Einwirken von TFA/Wasser/Triisopropylamin. DOTA-bis-Procainamid wurde mittels Diethylether ausgefällt.

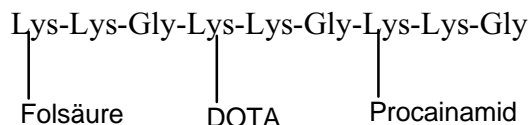
ESI-MS: m/z 839,5 (M+H<sup>+</sup>).

84 mg (0,1 mmol) DOTA-bis-Procainamid wurden mit 33,4 mg (0,1 mmol) Gadoliniumacetat 24 Stunden lang refluxiert. Der entsprechende Gadoliniumkomplex bildete sich nicht.

**(DOTA)-Lys-(Bernsteinsäure-Procaïnamid)-(Arg)<sub>8</sub> (54)**



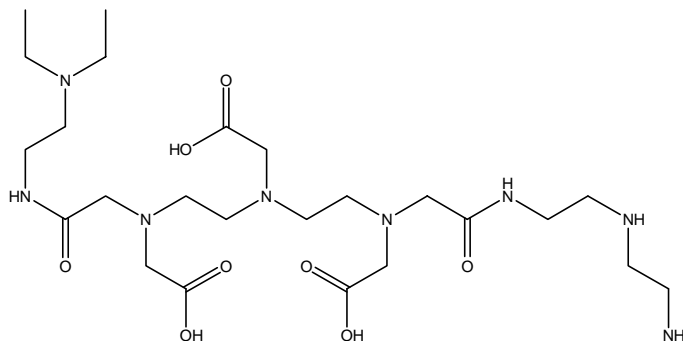
**Gly-Lys-Lys(Procainamid)-Gly-Lys-Lys-(DOTA)-Gly-Lys-Lys(Folsäure) (55)**



Das Produkt wurde mittels Merrifield Festphasensynthese hergestellt unter Verwendung eines Standardprotokolls. Zunächst wurde das Tripeptid Gly-(Boc)Lys-Fmoc-(Dde)-Lys synthetisiert. Nach Hydrazinolyse der Dde-Schutzgruppe erfolgte die Umsetzung des am Harz gebundenen Peptides mit Bernsteinsäureanhydrid. Danach wurde die Bernsteinsäureanhydridlösung entfernt und das Harz mehrmals mit DMF gewaschen. Es wurde Procainamid mittels HATU an die nun vorhandene freie Säuregruppe konjugiert. Die Reaktionszeit für diesen Schritt betrug eine Stunde. Wieder wurde mit DMF gewaschen, gefolgt von der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin/DMF. Das mit Procainamid derivatisierte Tripeptid wurde elongiert, durch die Kopplung mit Fmoc-Gly, Fmoc-(Boc)-Lys, Lys-Fmoc-(Dde)-Lys. Wieder wurde die Dde-Schutzgruppe hydrazinolytisch eliminiert. Die freie Seitenkettenaminogruppe des Lysins wurde mittels HATU an DOTA tris(tert. butylester) konjugiert. Die Kopplungszeit betrug 2 Stunden. Nun wurde mit DMF gewaschen und die Fmoc-Schutzgruppe abstrahiert. Die weitere Verlängerung der Hauptkette erfolgte mit Fmoc-Gly, Fmoc-(Boc)-Lys, Lys-Fmoc-(Dde)-Lys. Die Hydrazinolyse der Dde-Schutzgruppe wurde gefolgt von der Konjugation mit Folsäure. Da die Folsäure nicht ausreichend in DMSO oder DMF löslich war, musste Wasser als Lösungsmittel verwendet werden und das wäßrige Kopplungsreagenz EDC. Die Kopplungszeit betrug 3 Stunden. Die Abspaltung vom Harz und die simultane Abspaltung aller Schutzgruppen erfolgte mittels TFA/Wasser/Triisopropylsilan. Das Rohprodukt wurde aus der Abspaltlösung mittels Diethylether ausgefällt. Die Aufreinigung erfolgte mittels präparativer HPLC auf einer  $Rp_{18}$ -Säule mit Acetonitril/Wasser 80:20 (Fließmittel B) und 0,1% HCl in Wasser (Fließmittel A) als Fließmittel. Gradient: 1% Fließmittel B auf 50% Fließmittel B in 30 Minuten. Das Produkt wurde gefriergetrocknet. Ausbeute 12,2 mg (12,2 %).

ESI-MS:  $m/z$  2020,14 ( $M+H^+$ ). Die Reinheit des Produktes wurde HPLC analytisch nachgewiesen.

**(([2-(2-Amino-ethylamino)-ethylcarbamoyl]-methyl)-{2-[carboxymethyl-(2-{carboxymethyl-[(2-diethylamino-ethylcarbamoyl)-methyl]-amino}-ethyl)-amino]-ethyl}-amino)-essigsäure (56)**



Eine Lösung von 357 mg (1 mmol) DTPA-dianhydrid in wasserfreiem DMF wurde unter Argonatmosphäre mit 116 mg (1 mmol) Diethylaminoethylamin und 103 mg (1 mmol) Bis-(2-aminoethyl)-amin versetzt. Die Suspension wurde 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die 24 Stunden um waren, wurden 2 mL Wasser hinzuge tropft und für weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Ölpumpenvakuum entfernt, der Rückstand in Methanol aufgenommen und mittels präparativer DC auf Kieselgel unter Verwendung von  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}:\text{Et}_3\text{N}$  (80:18:2) als Fließmittelgemisch aufgereinigt. Das Produkt wurde mittels Methanol aus dem Kieselgel eluiert.

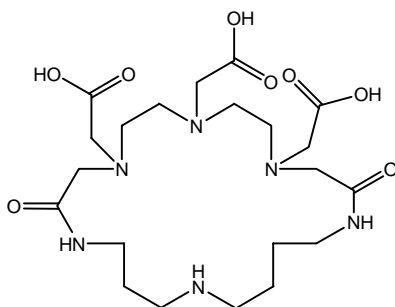
ESI-MS:  $m/z$  577,4 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\delta$ ;  $\text{D}_2\text{O}$  und  $d\text{-DMSO}$ ): 0,908 (t, 6 H); 2,366 (q, 4 H); 2,588 (m, 18 H); 3,062 (m, 10 H); 7,946 (s, 1 H); 8,468 (s, 3 H); 8,789 (s, 1 H).

**Gadoliniumkomplex von ([2-(2-Amino-ethylamino)-ethylcarbamoyl]-methyl)-{2-[carboxymethyl-(2-{carboxymethyl-[(2-diethylamino-ethylcarbamoyl)-methyl]-amino}-ethyl)-amino]-ethyl}-amino)-essigsäure (57)**

58 mg (0,1 mmol) **56** und 33,4 mg Gadoliniumacetat (0,1 mmol) in Wasser wurden 24 Stunden lang refluxiert. Das Produkt fiel während des Refluxierens aus der wässrigen Lösung als weißer Niederschlag aus, wohingegen die Edukte in Lösung blieben. Ausbeute: 4,6 mg (6,2 %).

ESI-MS: 732,3  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ). Das Massenspektrum zeigte keine anderen Peaks außer dem Produktpeak.

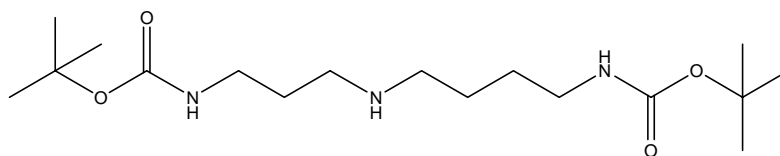
**4,10-Bis-(carboxymethyl)-2,12-dioxo-(1,4,7,10,13,17-hexaaza-cyclohenicos-7-yl)-essigsäure (58)**



Eine Lösung von 357 mg (1 mmol) DTPA-dianhydrid in wasserfreiem DMF wurde unter Argonatmosphäre mit 290 mg (2 mmol) Spermidin versetzt. Die Suspension wurde 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die 24 Stunden um waren, wurden 2 mL Wasser hinzuge tropft und für weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

ESI-MS:  $m/z$  503,3 ( $M+H^+$ ).

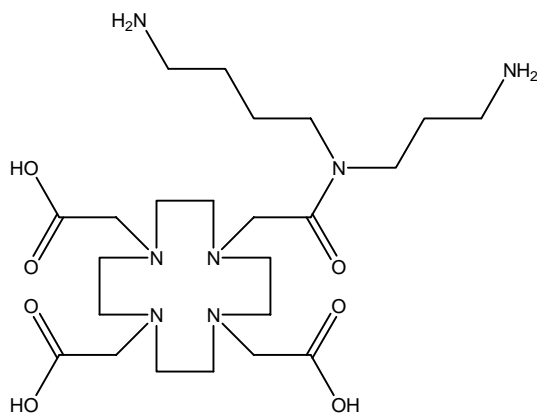
**[4-(3-tert. Butoxycarbonylamino-propylamino)-butyl]-carbaminsäure tert. butylester (59) [95],[96]**



150 mL wasserfreies Toluol, 2,96 g (40 mmol) tert. Butanol, 56 mg KOH (1 mmol) und 6,5 g (40 mmol) CDI wurden 3 Stunden lang unter Rühren auf 60°C erhitzt. Nach den drei Stunden wurde eine Lösung von 2,9 g (20 mmol) Spermidin in 5 mL Toluol tropfenweise zugegeben. Es wurde für weitere 3 Stunden unter Rühren bei 60°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel am Rotationsdampfer entfernt, der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit Wasser gespült. Die organische Phase wurde über  $Na_2SO_4$  getrocknet und danach am Ölpumpenvakuum trockengezogen. Das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten.

ESI-MS:  $m/z$  344,2 ( $M-H^-$ ).

**4-{[4-(Aminobutyl)]-[3-aminopropyl]carbamoyl-methyl}-7,10-bis-[carboxymethyl]-  
(1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl)]-essigsäure (60)**



380 mg (1 mmol) HATU und 572 mg DOTA-tris(t-Bu)-Ester (1 mmol) wurden in 3 mL CH<sub>3</sub>CN gelöst. 345 mg (1 mmol) **59** wurden mittels Diisopropylethylamin in 2 mL CH<sub>3</sub>CN in Lösung gebracht. Die HATU/ DOTA-tris(t-Bu)-Ester-Lösung wurde zur Lösung von **59** gegeben und drei Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Lösungsmittel am Ölpumpenvakuum abgezogen worden war, erfolgte die säulenchromatografische Aufreinigung auf Kieselgel mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH:Et<sub>3</sub>N (70:28:2) als Lösungsmittelgemisch. Aus den Fraktionen, die nur das Produkt enthielten, wurde durch Entfernen des Lösungsmittels das Boc-geschützte Produkt erhalten, das dann mit 1 mL TFA, 0,1 mL Aqua bidest. und 50 µl Triisopropylsilan 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt wurde. Das Lösungsmittel wurde am Ölpumpenvakuum entfernt. Die Kristallisation gelang aus Methanol: Ethylacetat: Chloroform = 1:1:1. Die Rekristallisation aus dem gleichen Lösungsmittelgemisch lieferte 28 mg (5,3 %).

ESI-MS: m/z 532,4 (M+H<sup>+</sup>). Die Reinheit wurde HPLC analytisch gezeigt.

### 5.3. Zellkulturversuche/ Biologische Experimente

#### 5.3.1. Zellfreie Versuche

##### 5.3.1.1. Ethidiumbromidausschlußassay [104]

Die Inkubation der doppelsträngigen Thymuskälber DNS mit unterschiedlichen Zytostatikakonzentrationen erfolgte in Reagenzgläsern. Jedes Reagenzglas wurde mit 6 µl einer Lösung von Kälber-Thymus-DNS (1 mg/mL), 500 µL PBS-Puffer und 0, 2, 5 oder 10 µl einer 1 mM Lösung des Zytostatikums befüllt. Getestet wurden Chlorambucil, Dacarbazin, Verbindung **1**, **2**, **9**, **16** und **26**. Die Lösungen wurden 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben mit PBS-Puffer auf 3000 µl aufgefüllt und gerüttelt. Aliquote von 200 µL der verdünnten Proben wurden je in ein Well einer 96 Well Mikrotiterplatte überführt. Es wurden von jeder Probe Dreifachbestimmungen gemacht. Zu den Lösungen auf der Mikrotiterplatte wurden pro Well 2 µL einer Ethidiumbromidlösung pipettiert (0,05 mg/mL) und anschließend sofort die Fluoreszenzausbeute mittels eines Fluoreszenzreaders (Spectra Max Gemini XS, Molecular Devices, Ismaning, Germany) bestimmt. Die Anregungswellenlänge betrug 260 nm, die Emissionswellenlänge 600 nm.

##### 5.3.1.2. Bestimmung der Bindungsisotherme [123]

5 mg synthetisches Melanin wurden 60 Minuten lang mit verschiedenen Konzentrationen von Chlorambucil, Dacarbazin, **1**, **9**, **16**, **19** und **26** bei Raumtemperatur inkubiert. Das Volumen der Lösungen betrug 800 µL und der pH-Wert lag bei 4. Zur besseren Verteilung des Melanins wurde sofort nach Zugabe der Lösungen zum Melanin Ultraschall angewendet. Die Proben wurden während der Inkubationszeit gerüttelt.

Nach Beedigung der Inkubationszeit wurden die Proben 3 Minuten lang ultrazentrifugiert und sterilfiltriert. Der Anteil an freiem Chlorambucil, **1** und **9** wurde HPLC analytisch bestimmt. Dazu wurde eine Eichkurve angefertigt. Der Anteil der ungebundenen Triazene Dacarbazin, **16**, **19** und **26** wurde mittels UV-Vis-Spektroskopie festgestellt. Zunächst wurde das Absorptionsmaximum bestimmt und eine Eichkurve beim Absorptionsmaximum aufgestellt. Danach wurde die Absorption der ultrazentrifugierten und sterilfiltrierten Proben ermittelt.

#### 5.3.2. Zellkulturversuche

##### 5.3.2.1. In-vitro Zellaufnahme Studien

B16 Melanomzellen und Morris Hepatoma Zellen (MH3924A) wurden bei 37°C in einer Atmosphäre, bestehend zu 95% aus Luft und zu 5 % aus CO<sub>2</sub>, und in Kulturflaschen in 20 mL RPMI-1640 Medium mit Glutamax-I (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland), versetzt mit 100000 I.E./l Penicillin, 100 mg/l Streptomycin und 10 % fetalem Kälberserum [10 % bei B16 und 20% bei MH3924A), kultiviert.

Die Zellen wurden durch Trypsinierung mit 3 ml Trypsin-EDTA Lösung (Glico BRL) geerntet und in 20 ml Medium resuspendiert. Nachdem sie gezählt worden waren, wurden die Zellen für die Zellanreicherungsstudien verwendet. Je 2 ml der Suspension, die  $5 \times 10^4$  Zellen enthielten, wurden in eine 6-Well Platte überführt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Nach zweitägigem Wachstum wurde das Medium entfernt und durch eine Lösung mit 74 kBq/well von  $^{131}\text{I}$  markiertem Chlorambucil, Verbindung 1 oder Verbindung 2 ersetzt. Die Zellen wurden bei 37°C 5, 10, 20, 60 und 120 Minuten mit diesen Lösungen inkubiert. Nachdem die Inkubationszeit vorbei war, wurden die Zellen zweimal mit eiskühlem Phosphatpuffer (PBS) gewaschen und auf Eis mit 0,5 ml 0,3 M NaOH Lösung lysiert. Die Radioaktivität jedes Wells wurde mit einem Gamma-Counter (Cobra II, Canberra Packard, Meriden, CT, USA) gezählt, während die Zahl der lebenden Zellen mittels Coulter Counter (Coulter Electronics, Dunstable, U.K.) bestimmt wurde. Die prozentuale Zellaufnahme der  $^{131}\text{I}$  markierten Verbindungen 1 und 2 sowie Chlorambucil wurde berechnet als  $\%ID = (\text{cpm}_{\text{Lysat}} / \text{cpm}_{\text{total counts}}) \times (100,000 / \text{Gesamtzellzahl})$ .

### 5.3.2.2. Organverteilungsstudien [124]

Die Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den Deutschen Tierschutzgesetzen durchgeführt (Genehmigung: 37-9185.81/79/95, Reg.-Präsidium, Karlsruhe). Die Organverteilungsstudien wurden mit C57B1/6 Mäusen durchgeführt, die B16 Mausmelanome hatten. Die Tumorzellen (DKFZ, Heidelberg) wurden mit PBS gewaschen und subkutan transplantiert durch die Injektion von  $0.5 \times 10^6$  Zellen (0.1 mL) in den linken Rumpf. 10 bis 14 Tage später wurde jedem Tier (20-29 g) eine der mit  $^{131}\text{I}$  markierten Verbindungen (2-3 MBq Dosen) in die Schwanzvene injiziert (i.v.). Das Injektionsvolumen wurde durch Wiegen der Spritze vor und nach der Injektion bestimmt. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Injektion wurden die Tiere gewogen, getötet und seziert. Organe und Gewebe wurden getrocknet und gewogen. Die Menge an Radioaktivität in den Geweben und in den Standards der injizierten Dosen wurde mit einem Gamma-Counter ermittelt. Die Ergebnisse wurde ausgedrückt als  $\%ID/g$  Gewebe.

### 5.3.2.3. Zytotoxizitätsuntersuchungen [125]

Der MTS Viabilitäts Assay (Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous nicht-radioaktiver Proliferationsassay; Promega, Madison, WI) wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Die Tumorzellen (DKFZ, Heidelberg) B16 Melanomzellen, Morris Hepatom Zellen (MH3924A) SkMel 28, 3T3 NIH und HeLa Zellen wurden 24 Stunden lang in 96 Well Mikrotiterplatten bei 37°C in einer Atmosphäre aus 95% Luft und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Das Kulturmedium bestand aus RPMI 1640 und DPBS buffer (beide von Pan Biotech, GmbH, Aidenbach). 24 Stunden später wurden die Zellen mit den Testverbindungen 1 Stunde lang inkubiert; bei den Triazenen wurde eine 24 stündige Inkubationszeit gewählt. Die Proliferationsrate wurde bestimmt, indem 48 später die optische Dichte bei 490 nm mittels eines Mikrotiterplatten-Readers Model 3350-UV (Biorad Laboratories GmbH, München) gemessen wurde.

Die Verbindungen wurden in DMSO gelöst, so dass die Stammlösung 100 mM war. Die Konzentrationen, mit denen die Zellen in Berührung kamen, betrugen 0, 1, 10, 25, 50, 75, 100 und 250  $\mu\text{M}$ . Die Ergebnisse wurden in Form von Dosis-Wirkungskurven dargestellt.

#### **5.3.2.4. Konkurrenzexperiment**

B16-Melanomzellen wurden 60 Minuten lang mit verschiedenen Konzentrationen von *N*-Acetylprocainamid inkubiert (0  $\mu\text{M}$  - 100  $\mu\text{M}$  - 250  $\mu\text{M}$  - 500  $\mu\text{M}$ ). Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden 60 Minuten lang mit 0, 10, 25, 50, 75 und 100  $\mu\text{M}$  der Verbindung **1** inkubiert. Das Medium wurde entfernt, die Zellen wurden dreimal mit DPBS gewaschen und wieder mit Medium bedeckt. 24, 48 und 72 Stunden nach der Inkubation mit Verbindung **1** wurde der MTS-Assay durchgeführt.

#### **5.3.2.5. Einfluß von synthetischem extrazellulärem Melanin auf die Zytotoxizität der Benzamide [106]**

Verbindung **1** und **26** und verschiedene Melaninmengen wurden separat direkt nacheinander zu MH3924A Zellen gegeben. Die Melaninkonzentrationen waren 0, 0.05, 0.25 und 0.5 mg/mL und die Konzentrationen der Benzamidkonjugate 0, 1, 10, 25, 50, 75, 100 und 250  $\mu\text{M}$ . Nach 24 Stunden wurde das melaninhaltige Medium entfernt, die Zellen wurden zweimal mit DPBS gewaschen und wieder mit Medium bedeckt. 48 Stunden später wurde der MTS Assay durchgeführt.

Einer Methode von Svensson folgend, wurden die Benzamidkonjugate mit synthetischem Melanin präinkubiert. Verbindung **1**, **9**, **16** und **26** und synthetisches Melanin wurden zusammen in Kulturmedium gegeben, so dass die Melaninkonzentration 0,25 mg/mL betrug und die Konzentration der Verbindungen **1**, **9**, **16** und **26** folgende Konzentrationen hatte: 0, 1, 10, 25, 50, 75, 100 und 250  $\mu\text{M}$ . Nach einer Stunde wurde zentrifugiert und sterilfiltriert. Die Filtrate wurden zu MH3924A gegeben. 72 Stunden später wurde der MTS Assay durchgeführt.

#### **5.3.2.6. Einfluß eines niedrigen intrazellulären Melaningehaltes in B16 Melanomzellen auf die Zytotoxizität von Verbindung 1,9,16 und 26 [108]**

Entsprechend einer Methode, die von Slominski et al. beschrieben wurde, wurden B16 Melanomzellen viermal in RPMI Medium kultiviert, dass jeweils 100  $\mu\text{M}$  Phenylisothioharnstoff (PTU) enthielt, was zu einer verminderten Tyrosinaseaktivität führt. Die mit PTU behandelten Zellen wurden mit Verbindung **1**, **9**, **16** und **26** mit den vorher erwähnten Konzentrationen inkubiert und nach 24, 48 und 72 Stunden wurde der MTS Assay durchgeführt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

#### **5.3.2.7. Einfluß der Benzamidkonjugate auf den pH-Wert der B16-Melanomzellen [105]**

$10^5$  B16 Melanomzellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und 24 Stunden lang bei 37°C anwachsen gelassen. Der einstündigen Inkubation einer 50  $\mu\text{M}$  Lösung der Benzamidkonjugate **1**, **9**, **16** oder **26** folgte die Gabe von 20  $\mu\text{M}$  Acridinorange und eine weitere Inkubation von 30 Minuten. Die auf den Deckgläschen adhären Zellen wurden mittels konfokaler

Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Auch andere Konzentrationen wurden untersucht. Allerdings wurden keine Fotos gemacht.

#### **5.3.2.8. Einfluß der Benzamidkonjugate auf die Tyrosinaseaktivität von B16 Melanom Zellen [115]**

Die Tyrosinaseaktivität wurde, Eberle et al., folgend mit einem spektrometrischen Assay für die Dopaoxidaseaktivität der Tyrosinase bestimmt. B16 Melanomzellen wurden mit den schon vorher verwendeten Konzentrationen an Verbindung **1**, **9**, **16**, **26**, **Chlorambucil** und **Dacarbazin** inkubiert. 24 Stunden nach der Gabe der Verbindung wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen, mit 0,1 % Tween 20 lysiert und in 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 6,8) gelöst. Sie wurden dann 30 Minuten lang bei -80°C aufbewahrt. Die Zellen wurden anschließend aufgetaut, bei 37°C im Dunkeln gehalten und mit 5 µl einer 10 nM L-Dopa (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin)-Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer versetzt. Die Absorption bei 490 nm wurde 5 Stunden lang nach der Zugabe von L-DOPA gemessen.; in der ersten Stunde alle 10 Minuten, danach alle 30 Minuten.

#### **5.3.2.9. Einfluß der Benzamidkonjugate auf den Melaniningehalt von B16 Melanomzellen [126]**

Normale und mit PTU (100 µM) behandelte B16 Melanomzellen wurden mit 50 µM Lösungen der Benzamidkonjugate **1**, **9**, **16**, **26**, **Dacarbazin** und **Chlorambucil** inkubiert. 1 Stunde nach Zugabe der Substanzen wurden diese entfernt, und frisches Medium wurde zugesetzt. 24 Stunden später wurden die Zellen 5 Minuten lang abtrypsiniert, 10 Minuten lang bei 100 Umdrehungen/min. zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Nach Zählung der Zellen und Einstellung auf Fraktionen gleicher Zellzahl ( $1,1 \times 10^6$  Zellen pro mL) wurden Portionen der Größe 10 mL 10 Minuten lang bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und das erhaltene Pellet mit 200 µl 1 N NaOH für 20 Minuten auf einem Rüttler inkubiert. Aliquote der resultierenden Mischung wurden in 96 Well Mikrotiterplatten überführt und die optische Dichte bei 405 nm bestimmt.

### **5.4. Zellaufnahmestudien der Gadoliniumkomplexe**

Die gleiche Anzahl an B16 Melanomzellen wurde in Zellkulturflaschen angesetzt und 24 Stunden lang mit 10 mL der entsprechenden Konzentration an Gadoliniumkomplex (1 µM, 2,5 µM, 5 µM und 10 µM) inkubiert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand entfernt, danach abtrypsiniert, in Medium aufgenommen und gezählt. Es wurde aus jedem Gefäß soviel entnommen, dass die Zellzahl aller Proben gleich groß war ( $3,5 \times 10^6$  Zellen). Die Zellen wurden herunterzentrifugiert und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Dann wurde das Zellpellet in 100 µL Aqua bidest aufgenommen, gefolgt von der Zugabe von 1,4 mL konz. Salpetersäure für die Spurenanalyse. Die verschlossenen Teflongefäßen befindlichen Proben wurden einem Druckmikrowellenaufschluß unterzogen mit einem Mars 5 Mikrowellengerät (CEM GmbH). Das Aufschlußprogramm sah folgende Parameter für den Aufschluß vor: 0 bis 15 Minuten: 0-0,5 bar, 300 W, 20 auf 150°C. Diese Bedingungen wurden 10 Minuten lang gehalten. Daran schloß sich eine Abkühlphase von 15 Minuten an, in welcher der Druck auf 0 bar zurückging. Nach dem Mikrowellenaufschluß wurden 850 µl der aufgeschlossenen Probe mit 750 µl Aqua bidest. und 100 µL einer Rhodiumchloridlösung (1000 µg/l) verdünnt. Das Rhodium fungierte als interner



Standard für die ICP-MS Messungen. Danach wurde der Gadoliniumgehalt mittels ICP-MS (Finnigan MAT, Bremen) bestimmt. Die Auflösung des Gerätes beträgt 4000 ( $\Delta m/m$ ). Die gleiche Prozedur wurde bei gut aufgenommenen Komplexen auch mit MH3924A wiederholt. Besonderheiten bei **54**, **55** und Diethylaminoethyldithiocarbamat: Aufgrund der Thermolabilität der Verbindungen **54** und **55** wurde die Komplexierung so vorgenommen, dass 100  $\mu\text{L}$  einer 100 mM Lösung des Chelatliganden mit 3,34 mg Gadoliniumacetat versetzt wurden. Auch Diethylaminoethylamindithiocarbamat wurde auf diese behandelt. Diese Lösungen wurden 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Zellen wurden mit diesen Lösungen 24 Stunden lang inkubiert. Die Komplexbildung wurde massenspektrometrisch nachgewiesen.

Komplex	Masse (ESI-MS) $m/z$ ( $M+H^+$ )
<b>54</b>	2252
<b>55</b>	2174
<b>Diethiocarbamat</b>	736

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Thews G, Ernst Mutschler E, Vaupel P. Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. Grundzüge der Pathologie - Tumoren. S. 41-46. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. Stuttgart 1991.
- [2] Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Chemotherapie maligner Tumoren. S. 739-762. Wiissenschaftliche Verlagsgesellschaft. Stuttgart. 1996.
- [3] Löffler G, Petreides PE. Physiologische Chemie. Tumorgewebe: S. 974-993. 4. Auflage, 1988, Springer Verlag.
- [4] Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmkologie und Toxikologie. 6. Auflage. Wissenschaftsverlag Mannheim - Leipzig - Wien - Zürich. 1992.
- [5] Roche Lexikon Medizin. Hoffmann LaRoche AG und Urban Schwarzenbach. München - Wien - Balimore. 4. Auflage. 1999.
- [6] Grünwald F, Munz, D L. Nuklearmedizin: Klinische Bedeutung gewachsen. Deutsches Ärzteblatt 1999, 96: A-206 / B-171 / C-157.
- [7] Wagner U. Ausgezeichnete Bilder des menschlichen Körpers. *Pharmazeutische Zeitung* 2003; **41**:48.
- [8] Gießen, H. Mäuseherz im Bild. *Pharmazeutische Zeitung* 2003; **44**: 41.
- [9] Hembold P, Marsch C, Bormann G. Untersuchungsverfahren und Praxis des Lymphknotenstagings bei malignen Hauterkrankungen. *Lymph. Fosch.* 2003; **7**:72-76.
- [10] Weishaupt D. Radiologie: zellspezifische Bildgebung mittels Magnetresonanztomografie - neue Möglichkeiten in der Diagnostik. *Schweiz. Med. Forum* 2003; **51/52**: 1279-81.
- [11] Caravan P, Ellison J J, McMurry T J, Lauffer R B. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem. Rev.* 1999; **99**:2293-2352.
- [12] Artemov D. Molecular magnetic resonance imaging with targeted contrast agents. *J Cell Biochem.* 2003 Oct 15; **90**(3):518-24.
- [13] Allen MJ, Meade TJ. Synthesis and visualization of a membrane-permeable MRI contrast agent. *J Biol Inorg Chem.* 2003; **8**:746-50.
- [14] Lipinski, C., et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* 1997; **46**: 3 - 25.
- [15] Bhorade R, Weissleder R, Nakakoshi T, Moore A, Tung CH. Macrocyclic chelators with paramagnetic cations are internalized into mammalian cells via a HIV-tat derived membrane translocation peptide. *Bioconjug Chem.* 2000; **11**:301-5.
- [16] Konda SD, Wang S, Brechbiel M, Wiener EC. Biodistribution of a 153 Gd-folate dendrimer, generation = 4, in mice with folate-receptor positive and negative ovarian tumor xenografts. *Invest Radiol.* 2002; **37**:199-204.
- [17] Konda SD, Aref M, Wang S, Brechbiel M, Wiener EC. Specific targeting of folate-dendrimer MRI contrast agents to the high affinity folate receptor expressed in ovarian tumor xenografts. *MAGMA.* 2001; **12**:104-13.
- [18] Hoffman A S et al. Design of smart polymers that can direct intracellular drug delivery. *Polym. Adv. Technol.* 2002; **13**:992-999.
- [19] Julliard M, Vernin G. Biological properties of antitumor triazenes. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 1981; **20**: 293.

- [20] Reid JM, Kuffel MJ, Miller JK, Rios R, Ames MM. Metabolic activation of dacarbazine by human cytochromes P450: the role of CYP1A1, CYP1A2, and CYP2E1. *Clin Cancer Res.* 1999;**5**:2192-7.
- [21] Kramer W, Wess G, Schubert G, Bickel M, Girbig F, Gutjahr U, Kowalewski S, Baringhaus KH, Enhnen A, Glombik H, et al. Liver-specific drug targeting by coupling to bile acids. *J Biol Chem.* 1992; **267**:18598-604.
- [22] Anel A, Halmos T, Torres JM, Pineiro A, Antonakis K, Uriel J. Cytotoxicity of chlorambucil and chlorambucil-fatty acid conjugates against human lymphomas and normal human peripheral blood lymphocytes. *Biochem Pharmacol.* 1990; **40**:1193-200.
- [23] Ohsawa N, Yamazaki Z, Wagatsuma T, Isurugi K. Bestrabucil: a possible target-oriented anticancer agent. *Gan To Kagaku Ryoho.* 1984; **11**:2115-24.
- [24] Holley JL, Mather A, Wheelhouse RT, Cullis PM, Hartley JA, Bingham JP, Cohen GM. Targeting of tumor cells and DNS by a chlorambucil-spermidine conjugate. *Cancer Res.* 1992; **52**:4190-5.
- [25] Giraud I, Rapp M, Maurizis JC, Madelmont JC. Synthesis and in vitro evaluation of quaternary ammonium derivatives of chlorambucil and melphalan, anticancer drugs designed for the chemotherapy of chondrosarcoma. *J Med Chem.* 2002; **45**:2116-9.
- [26] Hosain F, Spencer RP, Couthon HM, Sturtz GL. Targeted delivery of antineoplastic agent to bone: biodistribution studies of technetium-99m-labeled gem-bisphosphonate conjugate of methotrexate. *J Nucl Med.* 1996; **37**:105-7.
- [27] Nagy A, Schally AV, Halmos G, et al. Synthesis and biological evaluation of cytotoxic analogs of somatostatin containing doxorubicin or its intensely potent derivative, 2-pyrrolinodoxorubicin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 1794-1799.
- [28] Svensson HP, Frank IS, Berry KK, Senter PD. Therapeutic effects of monoclonal antibody-beta-lactamase conjugates in combination with a nitrogen mustard anticancer prodrug in models of human renal cell carcinoma. *J Med Chem* 1998; **41**: 1507-1512.
- [29] Pan P-C, Yun-Peng J, Yuen-Yin W, Kao Y-S. Synthesis of nitrogen mustards related to local anaesthetics, procaine, percaïne and others. *Sci Sin [Engl Ed]* 1960; **89**: 90 – 98.
- [30] Lin AJ, Loo TL. Synthesis and antitumor activity of halogen-substituted 4-(3,3-dimethyl-1-triazeno)quinolines. *J Med Chem.* 1978; **21**:268-72.
- [31] Derry E. V. Wilman, Peter J. COX, Phyllis M. Goddard, Leigh I. Hart, Kanti Merai, David R. Newell. Tumor Inhibitory Triazenes. 3. Dealkylation within an Homologous Series and its Relation to Antitumor Activity. *J Med Chem* 1984; **27**: 870-874.
- [32] Zheleva AM, Gadjeva VG. Spin labelled nitrosoureas and triazenes and their non-labelled clinically used analogues--a comparative study on their physicochemical properties and antimelanomic effects. *Int J Pharm.* 2001; **212**:257-66.
- [33] Greish K, Fang J, Inutsuka T, Nagamitsu A, Maeda H. Macromolecular therapeutics: advantages and prospects with special emphasis on solid tumour targeting. *Clin Pharmacokinet.* 2003; **42**:1089-105.
- [34] Pavel S, Smit NP.. Metabolic interference of melanogenesis in pigment cells. *Sb Lek.* 1996; **97**:29-39.
- [35] Bhatnagar V, Anjaiah S, Puri N, Darshanam BN, Ramaiah A. pH of melanosomes of B 16 murine melanoma is acidic: its physiological importance in the regulation of melanin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys.* 1993; **307**: 183-192.
- [36] Jimbow K, Oikawa O, Sugiyama S, Takeuchi T. Comparison of eumelanogenesis and pheomelanogenesis in retinal and follicular melanocytes; role of vesiculo-globular bodies in melanosome differentiation. *J Invest Dermatol.* 1979 ; **73**:278-84.

- [37] Opitz S., Zühlke C. Albinismus - Leben ohne Melanin. Teil 1 Biologie des Melaninstoffwechsels. *BIOforum* 2002, **10**: 674.
- [38] Shosuke I. A Chemist's View of Melanogenesis. *Pigment Cell Research* 2003; **16**: 230-36.
- [39] Hearing VJ, Jimenez M. Mammalian tyrosinase--the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int J Biochem.* 1987;**19**:1141-7.
- [40] Abbildung 1: Fitzpatrick, T.B.; Szabo, G.; Wick, M.M.. Biosynthesis of eumelanin and pheomelanin. *Biochemistry and Physiology of Melanin Pigmentation* 1981.
- [41] Luther U, Dickmann S, Norgauer J. Das maligne Melanom und seine Behandlung. *Medizinische Monatszeitschrift für Pharmazeuten* 2001, **11**:356-361.
- [42] Mohammed A. Inauguraldissertation Universität Heidelberg. 1995
- [43] Shahbazi-Gahrouei D, Williams M, Rizvi S, Allen BJ. In vivo studies of Gd-DTPA-monoclonal antibody and gd-porphyrins: potential magnetic resonance imaging contrast agents for melanoma. *J Magn Reson Imaging.* 2001; **14**:169-74.
- [44] Wendtner CM, Hallek M, Schmid-Wendtner, Volkenandt M. Medikamentöse Therapie bei Fernmetastasierung. *Manual Maligne Melanome* 2000. 65- 71
- [45] Balch CM, Reintgen DS, Kirkwood JM, Houghton A, Peters L, Kian Ang K, Cutaneous Melanoma. In DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia, New York: Lippincot-Raven Publishers, 1997: 1947-1994.
- [46] Jordan AM, Khan TH, Malkin H, Osborn HM, Photiou A, Riley PA. Melanocyte-Directed enzyme prodrug therapy (MDEPT) - development of second generation prodrugs for targeted treatment of malignant melanoma. *Bioorg Med Chem* 2001; **9**: 1549-1558.
- [47] Inoue S, Hasegawa K, Ito S, Ozeki H, Solano F, Jimenez-Cervantes C, Wakamatsu K, Fujita K. Antimelanoma effect of 4-S-cysteaminylcatechol - an activated form of 4-S-cysteaminylphenol. *Cancer Res* 1995; **55**: 2603-2607.
- [48] Morrison ME, Yagi MJ, Cohen G. In vitro studies of 2,4-dihydroxyphenylalanine, a prodrug targeted against malignant melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; **82**: 2960-2964.
- [49] Morandini R, Suli-Vargha H, Libert A, Loir B, Botyanszki J, Medzihradszky K, Ghanem G. Receptor mediated cytotoxicity of alpha-MSH fragments containing melphalan in a human melanoma cells line. *Int J Cancer* 1994; **56**: 129-133.
- [50] Ghanem GE, Libert A, Arnould R, Vercammen A, Lejeune F. Human. Melanoma targeting with alpha-MSH-melphalan conjugate. *Melanoma Res* 1991; **1**: 105-114.
- [51] Svensson SP, Lindgren S, Powell W, Green H. Melanin inhibits cytotoxic effects of doxorubicin and daunorubicin in MOLT 4 cells. *Pigment Cell Res.* 2003; **16**:351-4.
- [52] Tjalve H, Nilsson M, Larsson B. Binding of <sup>14</sup>C-spermidine to melanin in vivo and in vitro. *Acta Physiol Scand.* 1981; **112**:209-14.
- [53] Borges CR, Roberts JC, Wilkins DG, Rollins DE. Cocaine, benzoylecgonine, amphetamine, and N-acetylamphetamine binding to melanin subtypes. *J Anal Toxicol.* 2003; **27**:125-34.
- [54] Hu DN, Savage HE, Roberts JE. Abstract Uveal melanocytes, ocular pigment epithelium, and Muller cells in culture: in vitro toxicology. *Int J Toxicol.* 2002; **21**:465-72. Review.
- [55] Larsson BS. Interaction Between Chemicla sand Melanin. *Pigment Cell Research* 1993; **6**:127-133.
- [56] Salazar-Bookaman MM, Wainer I, Patil PN. Relevance of drug-melanin interactions to ocular pharmacology and toxicology. *J Ocul Pharmacol.* 1994; **10**:217-39. Review.
- [57] Eger K, Troschütz R, Roth HJ.. Arzneistoffanalyse - Reaktivität, Stabilität, Analytik. Stuttgart. 1999, 4. Auflage. Deutscher Apothekerverlag.

- [58] Oikawa A, Saeki H, Akiyama T, Matsumoto J. Electron microscopic evidence for stimulation of melanosomal maturation by lysosomotropic agents and monensin in cultured B16 mouse melanoma cells. *Pigment Cell Res* 1987; **1**:44-50.
- [59] Ancans J, Thody AJ. Activation of melanogenesis by vacuolar type H(+)-ATPase inhibitors in amelanotic, tyrosinase positive human and mouse melanoma cells. *FEBS Lett* 2000; **478**:57-60.
- [60] Eisenhut M, Hull WE, Mohammed A, Mier W, Lay D, Just W, Gorgas K, Lehmann WD, Haberkorn U. Radioiodinated N-(2-diethylaminoethyl)benzamide derivatives with high melanoma uptake: structure-affinity relationships, metabolic fate, and intracellular localization. *J Med Chem.* 2000; **43**:3913-22.
- [61] Brenner W, Klomp HJ, Bohuslavizki KH, Szonn B, Kampen WU, Henze E. Limited sensitivity of iodine-123-2-hydroxy-3-iodo-6-methoxy-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidiny)methyl]benzamide whole-body scintigraphy in patients with malignant melanoma: a comparison with thallium-201 imaging. *Eur J Nucl Med.* 1999; **26**:1567-71.
- [62] Dittmann H, Coenen HH, Zölzer F, Dutschka K, Brandau W, Streffer C. In vitro studies on the cellular uptake of melanoma imaging aminoalkyl iodobenzamide derivatives (ABA). *Nucl. Med. and Biol.* 1999; **26**:51-56.
- [63] Larisch R, Schulte KW, Vosberg H, Ruzicka T, Muller-Gartner HW. Differential accumulation of iodine-123-iodobenzamide in melanotic and amelanotic melanoma metastases in vivo. *J Nucl Med.* 1998; **39**:996-1001.
- [64] Labarre P, Papon J, Moreau MF, Moins N, Bayle A, Veyre A, Madelmont JC. Melanin affinity of N-(2-diethylaminoethyl)-4-iodobenzamide, an effective melanoma imaging agent. *Melanoma Research* 2002; **12**: 115-121.
- [65] Haapala E, Hakala K, Jokipielto E, Vilpo J, Hovinen J. Reactions of N,N-Bis(2-chlorethyl)-p-aminophenylbutyric acid with 2'-Deoxyguanosine. *Chem. Res. Toxicol* 2001, **14**: 988-995.
- [66] Connors, Kenneth A., Gordon L. Aminon und Valentino J. Stella. Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists. 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley & Sons. New York, 1986, pp 322-326.
- [67] Adams R, Ulich L H. The Use of Oxalyl Chloride and Bromide for Producing Acid Chlorides, Acid Bromides or Acid Anhydrides. *J. Am. Chem. Soc.* 1920; **42**:599-611.
- [68] Eisenhut M., Mohammed A., Mier W., Schönsiegel F., Friebe M., Mahmood A, Alun G. J. und Haberkorn U. Melanoma Uptake of 99m Tc Complexes Containing the N-(2-Diethylaminoethyl)benzamide Structural Element. *J. Med. Chem.*, 2002, **45**: 5802-05.
- [69] Haberkorn U, Kinscherf R, Krammer PH, Mier W, Eisenhut M. Investigation of a potential scintigraphic marker of apoptosis: radioiodinated Z-Val-Ala-DL-Asp(O-methyl)-fluoromethyl ketone. *Nucl Med Biol.* 2001; **28**:793-8.
- [70] Elderfield R C, Liao TK. Synthesis of Potential Agents. XII. Nitrogen Mustards from p-Aminobenzoic Acid Derivatives. 1961; **26**: 4995-6.
- [71] Ross WCJ, Warwick GP, Roberts JJ. Aryl-2-halogenalkylamines. Part XIV. Some Compounds possessing Latent Cytotoxic Activity.
- [72] Ware DC, Palmer D B, Willson W R, Denny W A. Hypoxia-Selective Agents. 7. Metal Complexes of Aliphatic Mustards as a New Class of Hypoxia-Selective Cytotoxins. Synthesis and Evaluation of Cobalt(III) Complexes of Bidendate Mustards. *J. Med. Chem.* 1993; **36**: 1839-1846.
- [73] Kimball D.B., Haley M.M. Triazene: Vielseitige Verbindungen für die organische Synthese. *Angewandte Chemie* 2002; **114**:3484-98.

- [74] Elks J., Hey D.H. Reactions with 1-Aryl-3,3-dimethyltriazenes. *J. Chem Soc.* 1943. 441-443.
- [75] Colas C, Goeldner M. An Efficient Procedure for the Synthesis of Crystalline Aryldiazonium Trifluoroacetates - Synthetic Applications. *Eur. J. Org. Chem* 1999; 1357-1366.
- [76] Riebeseel K, Biedermann E, Loser R, Breiter N, Hanselmann R, Mulhaupt R, Unger C, Kratz F. Polyethylene glycol conjugates of methotrexate varying in their molecular weight from MW 750 to MW 40000: synthesis, characterization, and structure-activity relationships in vitro and in vivo. *Bioconj Chem.* 2002; **13**:773-85.
- [77] Szpoganicz B, Gidanian S, Kong P, Farmer P. Metal binding by melanins: studies of colloidal dihydroxyindole-melanin, and its complexation by Cu(II) and Zn(II) ions. *Journal of Inorganic Chemistry* 2002; **89**:45-53.
- [78] Farmer P, Gidanian S, Shahandeh B, Di Bilio JA, Tohidian N, Meyskens JR FL. Melanin as a Target for Melanoma Chemotherapy: Pro-oxidant effect of Oxygen and Metals on Melanoma Viability. *Pigment Cell Research* 2003; **16**: 273-279.
- [79] Eisenhut M., Mohammed A., Mier W., Schönsiegel F., Friebe M., Mahmood A, Alun G. J. und Haberkorn U. Melanoma Uptake of 99m Tc Complexes Containing the N-(2-Diethylaminoethyl)benzamide Structural Element. *J. Med. Chem.*, 2002, **45**: 5802-05.
- [80] Römpp Chemielexikon, 6. Auflage, Franckh'sche Verlagshandlung Stuttgart, 1966. Bd 3, S. 4850.
- [81] Lehrbuch der Organischen Chemie. Beyer, Walter. 1991. S. Hirzel Verlag Stuttgart 22. Auflage. S. 520
- [82] T. Jüstel, J. Bendix, N. Metzler, T. Weyhermüller, B. Nuber, K. Wieghardt. Ruthenium complexes containing non-innocent o-benzoquinonediimine /o-phenylenediamide(2-) ligands. Synthesis and crystal structure of the nitrido bridged complex [ $\{\text{LRu}(\text{o-C}_6\text{H}_4(\text{NH}_2)_2)\}$ ]. *Inorg Chem.* 1998, **37**: 35- 43.
- [83] Sergheraet C., Maes P., Tartar A. J. *Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 2002. 1061-1064.
- [84] Altmann, E; Renaud J., Green J., Farley D., Cutting B. und Jahnke W. Arylaminoethyl Amides as Novel Non-Covalent Cathepsin K Inhibitors. *J. Med. Chem.*, 2002; **45**: 2352-54.
- [85] Basolo F, Pearson R G. Mechanismen in der anorganischen Chemie. Eine Untersuchung von Metallkomplexen in Lösungen. Stuttgart 1973. Thieme-Verlag.
- [86] Filira F, Biondi B, Biondi L Giannini E, Gobbo M, Negri E, Rocchi R. Opioid peptides: synthesis and biological properties of [(N-glucosyl,N-methoxy)-,diamino-(S)-butanoyl]-4-deltorphin-1-neoglycopeptide and related analogues. *Org. Biomol. Chem.*, 2003; **1**:3059 - 3063.
- [87] Schuhmacher J, Klivenyi G, Hull W, Matys R, Hauser H, Kalthoff H, Schmiegel WH, Maier-Borst W, Matzku S. A bifunctional HBED-derivative for labeling of antibodies with  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$  and  $^{59}\text{Fe}$ . Comparative biodistribution with  $^{111}\text{In}$ -DTPA and  $^{131}\text{I}$ -labeled antibodies in mice bearing antibody internalizing and non-internalizing tumors. *Nucl. Med. Biol.* 1992, **19**:809-824.
- [88] Hay WH, Nolan KB. Reactions of Co-ordinated Ligands. Hydrolysis of Tetramethyl Ethylene-diaminetetra-acetate and its Copper(II)Complexes. *J. Chem. Soc. Dalton Transactions*, 1348-51.
- [89] Mitchell DJ, Kim DT, Steinman L, Fathman CG, Rothbard JB. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J Pept Res.* 2000; **56**:318-25.
- [90] Suzuki T, Futaki S, Niwa M, Tanaka S, Ueda K, Sugiura Y. Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *J Biol Chem.* 2002; **277**:2437-43.
- [91] Zhou W, Yuan X, Wilson A, Yang L, Mokotoff M, Pitt B, Li S. Efficient intracellular delivery of oligonucleotides formulated in folate receptor-targeted lipid vesicles. *Bioconj Chem.* 2002;**13**:1220-5.

- [92] Quintana A, Raczka E, Piehler L, Lee I, Myc A, Majoros I, Patri AK, Thomas T, Mule J, Baker JR Jr. Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor. *Pharm Res.* 2002; **19**:1310-6.
- [93] Wang C, Delcros JG, Cannon L, Konate F, Carias H, Biggerstaff J, Gardner RA, Phanstiel IV O 4th. Defining the molecular requirements for the selective delivery of polyamine conjugates into cells containing active polyamine transporters. *J Med Chem* 2003; **46**:5129-38.
- [94] Minchin RF, Martin RL, Summers LA, Ilett KF. Inhibition of putrescine uptake by polypyridinium quarternary salts in B16 melanoma cells treated with difluoromethylornithine. *Biochem J* 1989; **262**:391-95.
- [95] Rannard SP, Davis NJ. The Selective Reaction of Primary Amines with Carbonyl Imidazole Containing Compounds: Selective Amide and Carbamate Synthesis. *Organic Letters* 2000; **2**: 2117-2120.
- [96] Controlled Synthesis of Asymmetric Dialkyl and Cyclic Carbonates Using the Highly Selective Reactions of Imidazole Carboxylic Esters. *Organic Letters* 1999; **1**:933-93
- [97] William DE. The development of a second-generation triazene. *Cancer Treat Rev.* 1988 Mar;**15**:69-72.
- [98] Ronney PH, Telfer C, McFayden MC, Mevin WT, Murray GI. The role of cytochrome P450 in cytotoxic bioactivation: future therapeutic directions. *Curr. Cancer Drug Targets* 2004; **4**:257-65.
- [99] Lin BF, Kim JS, Hsu JC, Osborne C, Lowe K, Garrow T, Shane B. Molecular biology in nutrition research: modeling of folate metabolism. *Adv Food Nutr Res.* 1996; **40**:95-106.
- [100] Gniazdowski M, Denny WA, Nelson SN, Czyz M. Transcription Factors As Targets for DNA-Interacting Drugs. *Current Medicinal Chemistry* 2003; **10**:909-924.
- [101] Anthony NG, Fox KR, Johnston BF, Khalaf AI, Mackay SP, McGroarty IS, Parkinson JA, Skellern GG, Suckling CJ, Waigh RD. DNA binding of a short lexitropsin. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004; **14**:1353-6.
- [102] Binding of AR-1-144, a tri-imidazole DNA minor groove binder, to CCGG sequence analyzed by NMR spectroscopy. *Eur J Biochem* 1999; **263**:646-55.
- [103] Dervan PB, Edelson BS. Recognition of the DNA minor groove by pyrrole-imidazole polyamides. *Curr Opin Struct Biol.* 2003; **13**:284-99.
- [104] Geall A J, Blagbrough I S. Rapid and sensitive ethidium bromide fluorescence quenching assay of polyamine conjugate-DNA interactions for the analysis of lipoplex formation in gene therapy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2000, **22**: 849-859.
- [105] Fuller BB, Spaulding DT, Smith DR. Regulation of the Catalytic Activity of Preexisting Tyrosinase in Black and Caucasian Human Melanocyte Cell Cultures. *Exp. Cell Research* 2001; **262**:197-208.
- [106] Svensson SP, Lindgren S, Powell W, Green H. Melanin inhibits cytotoxic effects of doxorubicin and daunorubicin in MOLT 4 cells. *Pigment Cell Res.* 2003; **16**:351-4.
- [107] Ancans J, Tobin DJ, Hoogduijn MJ, Smit NP, Wakamatsu K, Thody AJ. Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. *Exp Cell Res.* 2001; **268**:26-35.
- [108] Slominski A, Moellmann G, Kuklinska E. L-tyrosine, L-dopa, and tyrosinase as positive regulators of the subcellular apparatus of melanogenesis in Bomirski Ab amelanotic melanoma cells. *Pigment Cell Res.* 1989; **2**:109-16.
- [109] Darzynkiewicz Z. Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. *Methods in Cell Biology* 1990;. **33**:285-98.

- [110] Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*.1992; **13**:795-808.
- [111] Kliche KO, Clement JH, Höffken K. Apoptose - Mechanismen, Regulation und therapeutische Modulation als klinische Perspektive. *Onkologie* 1999; **5**:891–897.
- [112] A. Rickers. Identifikation molekularer Regulatoren der anti-IgM induzierten B-Zell-Apoptose. Dissertation. Humboldt-Universität Berlin. 1999.
- [113] Dobrucki J, Darzynkiewicz Z. Chromatin condensation and sensitivity of DNA in situ to denaturation during cell cycle and apoptosis - a confocal microscopy study. *Micron*. 2001; **32**:645-52.
- [114] Winder JA. A stopped spectrophotometric assay for the dopa oxidase activity of tyrosinase. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1994; **28**:173-183.
- [115] Eberle J, Wagner M, MacNeil S. Human melanoma cell lines show little relationship between expression of pigmentation genes and pigmentary behaviour in vitro. *Pigment Cell Res*. 1998; **11**:134-42.
- [116] Mitchell DJ, Kim DT, Steinmann L, Fathmann CG, Rotbard JB. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J. Peptide Research* 2000; **56**:318-325.
- [117] Suzuki T, Futaki S, Niwa M, Tanaka S, Ueda K, Sugiura Y. Possible Existence of Common Internalisation Mechanisms among Arginin-rich Peptides. *Journal of Biological Chemistry* 2002; **277**: 2437-2443.
- [118] Minchin RF, Raso A, Martin RL, Ilett KF. Evidence for the existence of distinct transporters for the polyamines putrescine and spermidine in B16 melanoma cells. *Eur. J. Biochem*. 1991; **200**:457-462.
- [119] Wiener EC, Konda S, Shadron A, Brechbiel M, Gansow O. Targeting dendrimer-chelates to tumors and tumor cells expressing the high-affinity folate receptor. *Invest Radiol*. 1997; **32**:748-54.
- [120] Nataly Wieberneit. Einsatz der ICP-Massenspektrometrie zur Multielementbestimmung in biologischen Proben. Dissertation. Hamburg. Februar 2001
- [121] Nataly Wieberneit. Einsatz der ICP-Massenspektrometrie zur Multielementbestimmung in biologischen Proben. Dissertation. Abbildung 10.Hamburg. Februar 2001. (Abbildung wurde komplett übernommen)
- [122] Nussbaum F, Miller B, Wild S, Hilger CS, Schumann S, Zorbas H, Beck W, Steglich W. Synthesis of 1-(2-Aminophenyl)isoquinolines and the Biological Activity of Their cis-Dichloro Platinum(II) Complexes. *J. Med. Chem*. 1999; **42**:3478-3485.
- [123] Banning TP, Heard CM. Binding of doxycycline to keratin, melanin and human epidermal tissue. *Int J Pharm*. 2002; **235**:219-27.
- [124] Mohammed A, Nicholl C, Titsch U, Eisenhut M. Radioiodinated N-(alkylaminoalkyl)-substituted 4-methoxy-, 4-hydroxy-, and 4-aminobenzamides: biological investigations for the improvement of melanoma-imaging agents. *Nucl Med Biol*. 1997; **24**:373-80.
- [125] Promega Cooperation. 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711-5399 USA. CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay - Instructions for use of products. Technical Bulletin No. 169.
- [126] Hakozaiki T, Minwalla L, Zhuang J, Chhoa M, Matsubara A, Miyamoto K, Greatens A, Hillebrand GG, Bissett DL, Boissy RE. The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and supression of melanosome transfer. *British Journal of Dermatology* 2002; **147**:20-31.



